



รายงานการวิจัย

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในมะม่วงน้ำดอกไม้  
เพื่อใช้บ่งชี้เอกลักษณ์ประจำพันธุ์

Nucleotide sequence analysis of *rbcl* genes in  
Mango CV. Namdokmai as indicator species identity

ศุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2558

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในมะม่วงน้ำดอกไม้  
เพื่อใช้บ่งชี้เอกลักษณ์ประจำพันธุ์

Nucleotide sequence analysis of *rbcl* genes in  
Mango CV. Namdokmai as indicator species identity

สุรเชษฐ เอี่ยมคำอาง สาขาวิชาชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนโดยงบประมาณแผ่นดินที่พิจารณาโดยผ่านความเห็นชอบจาก  
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ชื่อโครงการวิจัย	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ในมะม่วงน้ำดอกไม้เพื่อใช้ บ่งชี้เอกลักษณ์ประจำพันธุ์
ผู้วิจัย	สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง
ผู้ร่วมวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจพร ศรีสุวรรณาศ
สาขาวิชา	ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. 2558

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อบ่งชี้เอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของมะม่วงน้ำดอกไม้และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะม่วงน้ำดอกไม้และมะม่วงพันธุ์อื่นๆ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* เพื่อใช้บ่งบอกลักษณะประจำพันธุ์ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับมะม่วงอีก 5 พันธุ์ปลูก พบว่า มะม่วงน้ำดอกไม้ มีลำดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ต่างจากมะม่วงพันธุ์อื่นมากที่สุด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มีขนาด 484 นิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตาม หากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการต้องการให้มีการเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ต้องใช้ยีนชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น *atpF-atpH spacer*, *matK*, *rpoB* เพื่อให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

คำสำคัญ ยีน *rbcl*, นิวคลีโอไทด์, มะม่วงน้ำดอกไม้

Surachest Aiumsumang. 2014. Nucleotide sequence analysis of *rbcl* genes in Mango CV. Namdokmai as indicator species identity. Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University.

## ABSTRACT

The Study of indicator species identity of Mango CV. Namdokmai and evolutionary relationships compared other cultivars by nucleotide sequence analysis of *rbcl* gene to indicate the characteristics of the cultivars. The study show *rbcl* nucleotide sequence of Namdokmai and compared with the other five cultivars, This research have found countless *rbcl* nucleotide sequence of Namdokmai is different from most the other cultivars. The study found that the sequence nucleotide the 484 nucleotide. In addition, The phylogenetic analysis to be efficient by other genes must be involved as *atpF-atpH* spacer, *matK*, *rpoB* come together to analyze the genetic relationship is so much more effective. And useful knowledge to improve the genetic of plant.

Keywords: *rbcl* gene, nucleotide, Mango CV. Namdokmai

## กิตติกรรมประกาศ

วิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ ความกรุณา และคำปรึกษาจากบุคคลหลายฝ่าย ดังต่อไปนี้คือ ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ เพชรบูรณ์ ที่เอื้อเฟื้อวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการ ดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา และ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

10 พฤศจิกายน 2559

## สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ช
บทที่ 1	<b>บทนำ</b>	
	1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
	4. ขอบเขตของการวิจัย	3
	5. ขอบเขตระยะเวลา	3
บทที่ 2	<b>เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	4
	1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับมะม่วงน้ำดอกไม้	4
	2. การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล	5
	3. การเกิดรูปแบบลายสัคกีดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด	11
	4. การใช้ประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ DNA	11
	5. การจัดจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุล	12
	6. เทคนิคทางชีวโมเลกุล	13
	7. ชีวสารสนเทศ	17
บทที่ 3	<b>วิธีดำเนินการวิจัย</b>	19
	1. การสกัดแยกอาร์เอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อ	19
	2. การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ	21
	3. การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	21
	4. การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล	24
บทที่ 4	<b>ผลการวิจัย</b>	26
	1. ผลการสกัดดีเอ็นเอ	26
	2. ผลการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	28

	ข
	29
	30
	31
	35
บทที่ 5	37
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	33
	45
	50
	55
ประวัตินักวิจัย	55

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์	22
ตารางที่ 2	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	23
ตารางที่ 3	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ $\mu$ l)	26
ตารางที่ 4	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A260/A280 ของใบมะม่วง น้ำดอกไม้	27
ตารางที่ 5	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	29

## สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ภาพที่ 1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้	30
ภาพที่ 2	ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์จากดีเอ็นเอมะม่วงน้ำดอกไม้ บน 1.5 % agarose gel	31
ภาพที่ 3	ความสัมพันธ์เชิงวงศวานวิวัฒนาการของมะม่วงน้ำดอกไม้	36
ภาพที่ 4	เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)	46
ภาพที่ 5	เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)	46
ภาพที่ 6	เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Mupid-EXU® Gel Electrophoresis System)	47
ภาพที่ 7	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, SHIMADZU, รุ่น UV 1700)	47
ภาพที่ 8	สารละลายต้นต่อที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB	48
ภาพที่ 9	ชุดสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ (FTA™ Plant Kit, What Man, UK)	48
ภาพที่ 10	Agarose gel (Invitrogen™)	49
ภาพที่ 11	DNA Marker หรือ DNA Ladder (VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)	49
ภาพที่ 12	สีย้อมดีเอ็นเอ (6X Novel juice DNA staining dye, GeneDireX®)	49

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะม่วง พันธุ์น้ำดอกไม้เป็นมะม่วงที่ประเทศไทยประสบความสำเร็จในการส่งออกมากที่สุด และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วโลก โดยมีญี่ปุ่นเป็นตลาดหลัก แต่ปัจจุบันมะม่วงน้ำดอกไม้โดยเฉพาะน้ำดอกไม้สีทอง สามารถเข้าไปมีส่วนแบ่งใน ตลาดยุโรป นิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐประชาชนจีน ฯลฯ โดยเฉพาะ สาธารณรัฐประชาชนจีน มีตัวเลขการสั่งซื้อมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองจากประเทศไทย เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก เพราะจีนจะนิยมผลไม้ที่เป็นมงคล เช่น สีแดง หรือสี เหลืองทอง ดังนั้นจึงเป็น โอกาสดีที่ประเทศไทยจะต้องชิงความเป็นผู้นำด้านการ ตลาดมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองในจีนให้เป็นที่นิยมแพร่หลายมากขึ้น

#### ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Maniifera Indica* Linn.

ชื่อท้องถิ่น : มะม่วงน้ำดอกไม้, มะม่วงมันขุนศรี

ชื่อสามัญ : มะม่วงน้ำดอกไม้ (Mango Tree), มะม่วงมันขุนศรี

วงศ์ : Anacardiaceae

สกุล : *Maniifera*

ชนิด : *Indica*

ข้อมูลเทียบเคียงตัวอย่าง : ไม้ยืนต้น

รูปร่าง/ลักษณะ : มะม่วงน้ำดอกไม้เป็นมะม่วงประเภทรับประทานสุก ใบใหญ่เป็นคลื่น ทรงพุ่มโปร่ง ผลมีขนาดใหญ่ หนักประมาณ 400 กรัม ผลอ่อนเกือบกลมหัวใหญ่ปลายแหลม ผลค่อนข้างยาว เนื้อมาก เมล็ดเล็ก มีผิวบาง เมื่อดิบมีรสเปรี้ยว ผิวสีเขียวนวล เนื้อแน่น เมื่อผลสุกมีผิวสีเหลือง กลิ่นหอม เนื้อละเอียดมีเสี้ยนน้อย รสหวาน, มะม่วงเขียวเสวยเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 10–30 ม. ใบ ใบเดี่ยวสีเขียว ขอบใบเรียบ ฐานใบมน ปลายใบแหลม ดอกเป็นช่อ กลีบดอกมี 5 กลีบ เกสรสีแดง ผลดิบสีเขียว รสเปรี้ยวและหวานมัน เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือเหลืองส้ม, มะม่วงเขียวเสวยเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 10–30 ม. ใบ ใบเดี่ยวสีเขียว ขอบใบเรียบ ฐานใบมน ปลายใบแหลม ดอกเป็นช่อ กลีบดอกมี 5 กลีบ เกสรสี

แดง ผลรูปไข่กลับ ตรงใกล้ขั้วจะมีติ่งยื่นออกมาคล้ายนอแรด ผิวเปลือกสีเขียวเข้ม เนื้อสีขาวอมเขียว ผลดิบมีรสเปรี้ยว ผลสุกมีรสหวาน, ต้น สูง 10-20 ม. แตกกิ่งก้านสาขาเยอะ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับเป็นคู่ๆ รอบกิ่งก้านจำนวนมากบริเวณปลายกิ่ง ใบเป็นรูปใบหอก ปลายแหลม โคนมน สีเขียวสด ดอก ออกเป็นช่อแบบเชิงลดที่ปลายยอด แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก ดอกเป็นสีเหลืองนวล มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผลเป็นรูปกลมรีและยาว ปลายผลจะเรียวแหลมและงอนมาก

ในปัจจุบัน การบ่งชี้ชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสิ่งมีชีวิตมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างไม่จำกัด การให้ผลผลิตทางการเกษตรจึงต้องคำนึงถึงลักษณะทางพันธุกรรมเป็นอันดับต้นๆ เนื่องจากการระบุชนิดของพืชโดยใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธาน มักให้ความแม่นยำได้ในวงจำกัด ดังนั้นการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุลจึงมีบทบาทสำคัญในการจำแนกหรือระบุความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำกว่า

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์พืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาคำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม

DNA barcode เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบนั้น อาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและเป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่นๆ ที่ต้องการใช้เปรียบเทียบกัน วิธีการสร้างระบบ DNA barcode จะช่วยให้ระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ รวมถึง ในสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็ก ทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักอนุกรมวิธานและบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธานและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา นิเวศวิทยาศาสตร์และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพและเภสัชภัณฑ์

ยีน *rbcl* (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) ในพืชมีหลากหลายขนาด เช่น 1,428, 1,431 หรือ 1,434 คู่เบส เป็นยีนที่ไม่มีอินตรอน (intron) สอดแทรกอยู่ภายใน เมื่อถอดรหัส (transcription) และแปลรหัสจะได้หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์ รูบิสโก (rubisco) หรือ ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide fixation) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) มีรายงานว่าการใช้ยีน *matK* ร่วมกับ *rbcl* เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอจะช่วยให้การจัดกลุ่มและการพิสูจน์เอกลักษณ์ชัดเจนขึ้น (Plunkett *et al.* 1997) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของมะม่วงน้ำดอกไม้และมะม่วงพันธุ์อื่นๆ เพื่อหาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* มะม่วงแต่ละพันธุ์สำหรับการจำแนกพันธุ์

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* จากมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้และมะม่วงพันธุ์อื่นๆ โดยการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีน *rbcl* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing

2. เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* จากมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้และมะม่วงพันธุ์อื่นๆ เพื่อหาความแตกต่างและลำดับที่เฉพาะเจาะจงของลำดับยีน *rbcl* ของมะม่วงน้ำดอกไม้

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในมะม่วงน้ำดอกไม้

2. เป็นข้อมูลในการใช้จำแนกมะม่วงน้ำดอกไม้ออกจากต้นพันธุ์มะม่วงชนิดอื่นได้ หรือใช้ตรวจสอบการปลอมปนกับมะม่วงพันธุ์อื่น

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. การทดลองนี้ใช้มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในพื้นที่ตำบลคงมูลเหล็ก อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์

2. การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

3. คัดเลือกไพรเมอร์จากการออกแบบด้วยโปรแกรม primer3 ร่วมกับการสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ของยีน *rbcl* จากงานวิจัยที่ผ่านมา

4. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

5. ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของมะม่วง ด้วยเทคนิค DNA sequencing

## 1.5 ขอบเขตระยะเวลา

ระยะเวลาในการทำงานวิจัย เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2558

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับมะม่วงน้ำดอกไม้

##### ลักษณะทั่วไปของมะม่วงน้ำดอกไม้

มะม่วง พันธุ์น้ำดอกไม้เป็นมะม่วงที่ประเทศไทยประสบความสำเร็จในการส่งออกมากที่สุด และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วโลก โดยมีญี่ปุ่นเป็นตลาดหลัก แต่ปัจจุบันมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยเฉพาะน้ำดอกไม้สีทอง สามารถเข้าไปมีส่วนแบ่งใน ตลาดยุโรป นิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐประชาชนจีน ฯลฯ โดยเฉพาะ สาธารณรัฐประชาชนจีน มีตัวเลขการสั่งซื้อมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองจากประเทศไทย เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก เพราะจีนจะนิยมผลไม้ที่มีเป็นมงคล เช่น สีแดง หรือสี เหลืองทอง ดังนั้นจึงเป็น โอกาสดีที่ประเทศไทยจะต้องชิงความเป็นผู้นำด้านการ ตลาดมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองในจีนให้เป็นที่นิยมแพร่หลายมากขึ้น

##### อนุกรมวิธานของมะม่วงน้ำดอกไม้

มะม่วงน้ำดอกไม้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manifera Indica* Linn. ชื่อท้องถิ่นคือ มะม่วงน้ำดอกไม้ และชื่อสามัญว่า มะม่วงน้ำดอกไม้ (Mango Tree) อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae สกุล *Manifera* ชนิด *Indica* ลักษณะทั่วไปเป็น ไม้ยืนต้น

แหล่งกำเนิดมะม่วง (*Mangifera indica*) และมะม่วงป่า พบว่า พบฟอสซิลใบไม้คล้ายมะม่วงที่คาดว่าเก่าแก่ที่สุด มีอายุประมาณ 70-60 ล้านปี ถูกค้นพบที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย และตั้งชื่อว่า *Eomangiferophyllum damalgiensis* และล่าสุดที่เหมืองถ่านหินในบ้านป่าคา อ.สี จ. ลำพูน ฟอสซิลใบไม้มีอายุประมาณสมัยโอลิโกซีนตอนปลาย ถึงสมัยไม โอลิซีน หรือประมาณ 25 ล้านปี ได้ถูกค้นพบอีก หลังจากการวิเคราะห์ลักษณะของใบ ฟอสซิลใบไม้เหล่านี้ได้ถูกจำแนกออกเป็น 3 ชนิด ในสกุลมะม่วง และได้ให้ชื่อในเบื้องต้นว่า *Mangifera Paleo indica* ซึ่งลักษณะคล้ายกับมะม่วงชนิดที่ปลูกมาก *M. intermedia* และ *M. buchananoides* (เพราะใบคล้ายใบของต้น ไม้ชนิดหนึ่งในสกุล *Buchanania* ของวงศ์มะม่วง (Anacardiaceae) และจากฟอสซิลที่พบ คาดว่ามะม่วงน่าจะมีจุดกำเนิดบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย เรื่อยมาถึงภาคเหนือของพม่า และภาคเหนือของไทย และได้แพร่กระจายไปยัง มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ บอเนียว นิวกินี หมู่เกาะโซโลมอน และเกาะแคโลโล ซึ่งลักษณะของสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปอาจทำให้การกำเนิดสายพันธุ์ใหม่และการสูญไป อย่างไรก็ตามความเข้าใจในประวัติของการกำเนิด การแพร่กระจาย การสูญพันธุ์ และการเกิดพันธุ์ใหม่ๆ ต้องการข้อมูลของฟอสซิลที่พบในแต่ละพื้นที่และแต่ละช่วงเวลา

รูปร่าง,ลักษณะ : มะม่วงน้ำดอกไม้เป็นมะม่วงประเภทรับประทานสุก ใบใหญ่เป็นคลื่น ทรงพุ่มโปร่ง ผลมีขนาดใหญ่ หนักประมาณ 400 กรัม ผลอ่อนเกือบกลมหัวใหญ่ปลายแหลม ผลค่อนข้างยาว เนื้อมาก เมล็ดเล็ก มีผิวบาง เมื่อดิบมีรสเปรี้ยว ผิวสีเขียวจนวาว เนื้อแน่น เมื่อผลสุกมีผิวสีเหลือง กลิ่นหอม เนื้อละเอียดมีเสี้ยนน้อย รสหวาน, มะม่วงเขียวเสวยเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 10–30 ม. ใบ ใบเดี่ยวสีเขียว ขอบใบเรียบ ฐานใบมน ปลายใบแหลม ดอกเป็นช่อ กลีบดอกมี 5 กลีบ เกสรสีแดง ผลดิบสีเขียว รสเปรี้ยวและหวานมัน เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือเหลืองส้ม, มะม่วงเขียวเสวยเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 10–30 ม. ใบ ใบเดี่ยวสีเขียว ขอบใบเรียบ ฐานใบมน ปลายใบแหลม ดอกเป็นช่อ กลีบดอกมี 5 กลีบ เกสรสีแดง ผลรูปไข่กลับ ตรงใกล้ขั้วจะมีติ่งยื่นออกมาคล้ายนอแรด ผิวเปลือกสีเขียวเข้ม เนื้อสีขาวอมเขียว ผลดิบมีรสเปรี้ยว ผลสุกมีรสหวาน, ต้น สูง 10-20 ม. แตกกิ่งก้านสาขาเยอะ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับเป็นคู่ๆ รอบกิ่งก้านจำนวนมากบริเวณปลายกิ่ง ใบเป็นรูปใบหอก ปลายแหลม โคนมน สีเขียวสด ดอก ออกเป็นช่อแบบเชิงลดที่ปลายยอด แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก ดอกเป็นสีเหลืองนวล มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผลเป็นรูปกลมรีและยาว ปลายผลจะเรียวแหลมและงอนมาก

## 2.2 การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

ในปัจจุบัน การบ่งชี้ชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสิ่งมีชีวิตมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างไม่จำกัด การให้ผลผลิตทางการเกษตรจึงต้องคำนึงถึงลักษณะทางพันธุกรรมเป็นอันดับต้นๆ เนื่องจากการระบุชนิดของพืชโดยใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธานมักให้ความแม่นยำได้ในวงจำกัด ดังนั้นการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุลจึงมีบทบาทสำคัญในการจำแนกหรือระบุความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำกว่า

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์พืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม

DNA barcode เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อ

วิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบนั้น อาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและเป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่นๆ ที่ต้องการใช้เปรียบเทียบกัน วิธีการสร้างระบบ DNA barcode จะช่วยให้ระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ รวมถึง ในสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็ก ทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักอนุกรมวิธานและบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธาน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา นิติวิทยาศาสตร์และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพและเภสัชภัณฑ์

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์พืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม การใช้ประโยชน์ทางการศึกษาลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชหลายๆ ประการ เช่น ผลผลิต และลักษณะการเจริญเติบโตของพืช โดยลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกัน การแสดงออกเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาช่วยในการทำแผนที่ ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่สนใจจนสามารถนำส่วนของยีนที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์, 2545)

เทคโนโลยีดีเอ็นเอ เป็นเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ที่กำลังมีบทบาทสำคัญในการเกษตร โดยเฉพาะในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งถือว่าเป็นหัวใจสำคัญในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ ให้มีลักษณะตรงตามความต้องการของตลาด และมีผลผลิตสูงเป็นที่ต้องการของผู้ปลูก กระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นงานที่รวมทั้งศาสตร์และศิลป์เข้าด้วยกัน โดยอาศัยความพยายามของ นักปรับปรุงพันธุ์พืช ที่จะรวบรวมลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีเด่นจากแหล่งต่างๆ มา สร้างพืชพันธุ์ใหม่ โดยใช้กระบวนการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่เหมาะสม งานปรับปรุงพันธุ์พืช จึงมีความจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกของแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอ จึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เพราะเป็นการคัดเลือกพืชจากจีโนไทป์ (genotype) โดยตรง ซึ่งการศึกษาลักษณะดังกล่าว จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า เครื่องหมายทางพันธุกรรมเข้าช่วย

เครื่องหมายทางพันธุกรรม คือ ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทาง พันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้นๆ ไปยังรุ่นลูกได้ เครื่องหมายทาง

พันธุกรรมที่มีการใช้กันมานานแล้วในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ การใช้ลักษณะรูปพรรณสัณฐาน พืชที่มีความแตกต่างกันมาใช้เป็นเครื่องหมาย เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาดรูปร่างและสีของเมล็ด อายุวันออกดอก และวันเก็บเกี่ยว เป็นต้น โดยเรียกเครื่องหมายบ่งชี้นี้ว่า “เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา” (morphological markers) อย่างไรก็ตาม พบว่าลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ นอกจากนั้นแล้ว การเปรียบเทียบลักษณะภายนอกนี้ ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชบางชนิด ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาเครื่องหมายอื่นมาประกอบ เพื่อช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้อง

การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ นั่นเอง สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้

กระบวนการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญได้แก่ การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพโดยการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม และการติดตามการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางชีวภาพในแต่ละพื้นที่ ทั้งสองขั้นตอนสำคัญนี้ต้องเกี่ยวข้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้อง ซึ่งผู้ที่ทำหน้าที่นี้ได้เป็นอย่างดีที่สุดคือนักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญในการระบุสิ่งมีชีวิตเฉพาะกลุ่ม อย่างไรก็ตาม การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้องสามารถกระทำได้รวดเร็วและยังคงถูกต้องแม่นยำ แนวคิดของการใช้ลำดับดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์จำเพาะต่อสปีชีส์ในการระบุชนิดเกิดขึ้นจากการเล็งเห็นประโยชน์เมื่อประยุกต์ใช้ในเชิงอนุรักษ์ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

Hebert และคณะ (2003) เสนอคำว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อใช้สำหรับเรียกดีเอ็นเอบริเวณหนึ่งๆ ในจีโนมที่มีลำดับเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทำให้สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ ในทำนองเดียวกันกับแถบบาร์โคดของสินค้าที่ระบุชนิดของสินค้า กลุ่มวิจัยนี้ได้ทดสอบใช้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย บริเวณยีน Cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*Cox1* หรือ *COI*) ความยาว 648 คู่เบสในการระบุชนิดของสัตว์ และพบว่าเป็นเครื่องมือในการระบุชนิดของสัตว์หลายกลุ่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ โครงการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตหรือ The Barcode of Life Project ได้เริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 2003 (Hebert et al, 2003) และได้รับการสนับสนุนต่อเนื่องจากหน่วยงานที่เกิดขึ้นจากความร่วมมือจาก [Members details.htm](#))

สมาชิกได้มีส่วนร่วมในการทดสอบใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ และพบว่าลำดับเบสของยีน *COI* ใช้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดสัตว์ได้ค่อนข้างดี เช่น การศึกษานกในทวีปอเมริกาเหนือ พบว่านกทุกชนิดมีลำดับเบสของยีน *COI* ที่ต่างกันอย่างชัดเจน โดยมีความแตกต่างเฉลี่ยระหว่างชนิด (interspecific variation) และความแตกต่างเฉลี่ยภายในชนิด (intraspecific variation) เท่ากับ 7.93% และ 0.43% ตามลำดับ และจากงานวิจัยนี้ทำให้พบนกชนิดใหม่ 4 ชนิด เนื่องจากมีนก 4 ตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างออกไป จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานพฤติกรรม ร่วมกับเสียงร้องใหม่จึงทำให้จัดนกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างต่างนั้นเป็นนกชนิดใหม่ 4 ชนิด (Hebert et al., 2004)

ในขณะที่การค้นหาดีเอ็นเอบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืชยังเป็นความท้าทายเนื่องจากยีน *COI* จากไมโทคอนเดรียในพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการต่ำ ทำให้มีความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอไม่เพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกชนิดพืชได้ นักวิจัยจึงมุ่งความสนใจไปที่ลำดับดีเอ็นเอในพลาสติดิจโนมหลายกลุ่มวิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการระบุชนิดพืชของดีเอ็นเอบริเวณต่างๆ ในพลาสติด โดยบริเวณที่มีความเหมาะสมในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดควรมีลำดับเบสที่มีความแปรผันในต่างสปีชีส์ (interspecific variation) สูงกว่าความแปรผันภายในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecific variation) กลุ่มทำงานทางด้านพืช (Plant Working Group; PWG)

ใน CBOL ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอ 7 บริเวณในพลาสติดเพื่อประเมินความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ *atpF-atpH* spacer, ยีน *matK*, ยีน *rbcL*, ยีน *rpoB*, ยีน *rpoC1*, *psbK-psbI* spacer และ *trnH-psbA* spacer เกณฑ์ที่ใช้ประกอบการพิจารณาความเหมาะสมคือ การได้มาซึ่งลำดับดีเอ็นเอ คุณภาพของข้อมูล และความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ จากการศึกษาครั้งนี้ PWG สรุปว่าบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชคือ *rbcL* และ *matK* โดยต้องใช้ข้อมูลจากทั้งสองยีนร่วมกันในการระบุชนิดพืช (2-locus barcode) (CBOL Plant Working Group, 2009) อย่างไรก็ตามแม้คณะกรรมการระดับสูงของ CBOL สรุปยืนยันว่า *rbcL* และ *matK* ได้รับความเห็นชอบในการถูกกำหนดให้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชบก แต่คณะกรรมการยังคงเห็นควรว่า การศึกษาดีเอ็นเอบริเวณอื่นสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะยังเป็นประโยชน์ในการเป็นข้อมูลสำรองสำหรับความต้องการในบางกรณีที่ข้อมูลจาก *rbcL* และ ไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกสปีชีส์พืชบางกลุ่ม (CBOL, 2009)

สำหรับในกลุ่มพืช ยังไม่สามารถระบุบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode ได้แน่นอน ตัวอย่างการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับดีเอ็นเอที่ควรใช้เป็น DNA barcode ได้แก่ ในปี ค.ศ 1999 Hilu และ Alice ได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Poaceae โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *matK* พบว่ายีนนี้ถอดรหัสให้กรดอะมิโนจำนวนไม่เท่ากันใน และพบการเพิ่มหรือการ

ขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาบริเวณอื่น เช่น ยีน *rbcL* และบริเวณ ITS โดย Chase และคณะ (2005) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับเบสของยีน *rbcL* และ บริเวณ ITS จะเป็นข้อมูลที่ดี และมีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genebank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพื้นที่บางกลุ่ม และพบยังว่ายีน *matK* มีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่น เช่น สูงกว่ายีน *rbcL* 2-3 เท่า ทำให้มีตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์มากกว่า จึงทำให้เหมาะสมในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและชนิด และน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์ ในเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 จัดที่ New York Botanical Garden ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *matK* น่าจะเป็นบริเวณหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุพืช แต่ยังคงต้องทำการทดสอบเพื่อประเมินศักยภาพสำหรับการใช้งานจริงต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *matK* ในด้านของการนำมาใช้เป็น DNA barcode

#### บริเวณ *rbcL* และ *matK*

CBOL Plant Working Group (2009) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอมาตรฐานจากคลอโรพลาสต์จีโนม 7 บริเวณ ได้แก่ *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH* และ *psbK-psbI* เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการสร้าง DNA barcode กับพืช 907 ตัวอย่าง จาก 550 ชนิด โดยแบ่งเป็นพืชดอก 445 ชนิด (670 ตัวอย่าง) กลุ่มจิมโนสเปิร์ม 38 ชนิด (81 ตัวอย่าง) และกลุ่มไรเมสส์ 67 ชนิด (156 ตัวอย่าง) โดยเน้นที่คุณลักษณะ 3 ประการ คือ ความเป็นมาตรฐานสากล คุณภาพของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (sequence quality) และประสิทธิภาพในการแยกชนิดพืช (species discrimination) หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาทดสอบต้องให้ผลในการแยกและระบุชนิดพืชได้ดี หรือ มีความแม่นยำสูง

เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนและความรวดเร็วในการวิเคราะห์ผลร่วมด้วย CBOL Plant Working Group ได้เสนอให้ยีน *rbcL* และ ยีน *matK* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้สร้าง DNA barcode ในพืช โดยจะต้องใช้ร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการระบุชนิดพืชได้ดีที่สุด ผลการทดสอบพบว่า การใช้บริเวณยีนทั้งสองร่วมกันให้ผลในการระบุพืชในระดับชนิดได้ถูกต้อง ประมาณ 72% ของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา และในระดับสกุลระบุได้ถูกต้อง 100% แม้ว่าการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานร่วมกัน 3 บริเวณ เช่น *rbcL* + *matK* + *trnH-psbA* ระบุชนิดพืชในระดับชนิดได้ดีขึ้น (76%) แต่ไม่ได้ให้ผลแตกต่างกันมากนัก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนและใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้น CBOL Plant Working Group จึงได้เสนอให้ใช้เพียง 2 บริเวณร่วมกัน โดยเลือกใช้ยีน *rbcL* + *matK* แต่ไม่เลือกใช้ *rbcL* + *trnH-psbA* หรือ *matK* + *psbA* เนื่องจากคณะนักวิจัยพิจารณาแล้วว่าบริเวณ *trnH-*

*psbA* ยังมีปัญหาคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพไม่ดีนัก ดังนั้นคณะนักวิจัยจึงเสนอให้บริเวณ *trnH-psbA* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณเสริม (supplementary loci) เท่านั้น ส่วนบริเวณอื่นๆ พบว่ามีประสิทธิภาพในการนำมาใช้แยกและระบุชนิดพืชได้ไม่ดี หรือ บางบริเวณอาจให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คุณภาพไม่ดีจึงไม่ถูกล็อกมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

*rbcL* เป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) เอนไซม์ RubisCO ที่สมบูรณ์ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และขนาดเล็กรวมตัวกัน) จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO<sub>2</sub> ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis & Soltis, 1998) ความยาวของยีน *rbcL* มีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้าง DNA barcode จะใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาวตั้งแต่ 500-700 คู่เบส (Kress & Erickson, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Ebihara *et al.*, 2010) จุดเด่นของยีน *rbcL* ที่ CBOL Plant Working Group พิจารณาว่าเหมาะสำหรับเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานคือ มีความเป็นมาตรฐานสากล และให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีมาก แม้ว่าประสิทธิภาพในการนำไปใช้แยกและระบุชนิดพืชจะค่อนข้างต่ำแต่เมื่อใช้ร่วมกับบริเวณอื่น เช่น *matK* จะให้ผลการแยกและระบุชนิดพืชได้ดีขึ้น ส่วนยีน *matK* เป็นยีนที่มีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ maturase ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Group Ii introns splicing (Hilu & Liang, 1997) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานจะเลือกเพียงบางบริเวณของยีนให้มีความยาว 700-800 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ข้อดีของยีนนี้คือมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเพียงพอที่จะนำมาใช้ระบุชนิดพืชได้ดีอีกทั้งยังให้คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในเกณฑ์ดีเช่นเดียวกับยีน *rbcL* แต่ข้อด้อยของยีน *matK* ที่เป็นอุปสรรคสำหรับการนำไปใช้สร้าง DNA barcode คือมักไม่มีความเป็นมาตรฐานสากล กล่าวคือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีนนี้ให้ผลสำเร็จน้อยมาก โดยเฉพาะในกลุ่มพืชไร่เมล็ดซึ่งให้ผลสำเร็จเพียง 10% ส่วนในพืชกลุ่มจิมโนสเปิร์มให้ผลประมาณ 83% และในพืชดอกให้ผลดีที่สุุดประมาณ 90% (CBOL Plant Working Group, 2009)

ในปัจจุบัน ความพยายามในการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *matK* ให้ครอบคลุมพืชหลายกลุ่มนั้นยังไม่ประสบความสำเร็จ โดยเฉพาะในพืชกลุ่ม จิมโนสเปิร์ม และพืชไร่เมล็ดที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำได้ยากหรือไม่ได้ผล (Sass *et al.*, 2007) แม้กระทั่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *matK* ในพืชดอกส่วนใหญ่มักจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ถึง 2 คู่ หรือมากถึง 10 คู่ (Fazekas *et al.*, 2008; Lahaye *et al.*, 2008) รวมถึงจำเป็นต้องปรับสภาวะปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมแตกต่างกันไปในพืชแต่ละกลุ่มด้วย (Sass *et al.*, 2007; Fazekas *et al.*, 2008) ซึ่งนับว่าเป็นอุปสรรคสำคัญสำหรับการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความเป็นสากล การพัฒนาไพรเมอร์ของยีน *matK* ให้ได้กับพืชหลายกลุ่มอาจเป็นไปได้

ยาก แต่หากพัฒนาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับเฉพาะกลุ่ม เช่นกลุ่มพืชดอกที่นักวิจัยพัฒนาได้สำเร็จ ใกล้เคียง 100% (Fazekas *et al.*, 2008)

### 2.3 การเกิดรูปแบบลายตักยดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) ได้อธิบายไว้ว่า การทำให้เกิดรูปแบบลายตักยดีเอ็นเอมี 3 วิธีดังนี้

1. Hybridization-based methods เป็นวิธีใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายจีโนมิกดีเอ็นเอ ได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ตามความจำเพาะในการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoresis) และตรวจสอบด้วยการจับ (hybridization) กับดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe) ที่เป็น DNA คู่สม (complementary DNA) ซึ่งติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีหรือสารเคมี จะได้รูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายตำแหน่ง (multilocus band pattern) ที่มีความหลากหลาย วิธีนี้เรียกว่า RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

2. Sequencing-based methods เป็นวิธีการจำแนกชนิดของพืชโดยวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเพิ่ม (insertion) การแทนที่ (substitution) หรือการทดสอบในส่วนของยีนที่มีการใช้ในการศึกษา เช่น internal transcribed spacer (ITS) และยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น ยีน *trnK*, ยีน *matK* และ ยีน *rbcL* เป็นต้น วิธีนี้เรียกว่า RAPD (Random amplify polymorphism DNA)

3. PCR-based method เป็นวิธีที่ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) หรือไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับและดำเนินปฏิกิริยา PCR สร้างดีเอ็นเอเป้าหมายขึ้นมาใหม่ ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส จะได้รูปแบบหรือชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้จำแนกความหลากหลายของพืชได้

### 2.4 การใช้ประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ DNA

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) ได้สรุปประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอไว้ดังนี้

1. เพื่อใช้โมเลกุลเครื่องหมาย (Molecular Marker) ในการจำแนกพันธุ์พืช
2. เพื่อให้เห็นความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของพืช ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยการมองด้วยสายตา
3. เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้ โดย

3.1 ช่วยในการตรวจสอบ Somaclonal Variation ในกรณีที่มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 ช่วยในการตรวจสอบ linkage ระหว่าง DNA marker กับลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อพันธุ์พืช เช่น ต้านทานโรคและแมลง ฯลฯ เพื่อช่วยในการคัดเลือกและหาตำแหน่งยีนบนโครโมโซม

3.3 ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้เร็วยิ่งขึ้น โดยไม่ต้องรอเวลาออกดอกหรือผล

4. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืช

## 2.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุล

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือใน ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือ โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี้เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้

## 2.6 ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าสู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็น คู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) ตัวอย่างได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (Tanksley *et al.*, 1989, McCouch and Tanksley, 1991, Kochert, G., 1994)

2. PCR-based marker เป็น เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction (PCR) technique) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟดี (RAPD marker) (William *et al.*, 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) (Vos *et al.*, 1995), และเครื่องหมายไมโครแซทเทล-ไลท์ (Microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR marker) (Brown *et al.*, 1996, Powell *et al.*, 1996) เป็นวิธีที่ใช้ ดีเอ็นเอ ตรวจสอบ (DNA probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ สายเดี่ยวขนาดเล็กที่ทราบลำดับเบสและทำการติดฉลากสารกัมมันตรังสีเพื่อใช้ในการติดตามผลนำมาทำปฏิกิริยากับ ดีเอ็นเอ ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจที่ถูกแยกเป็นเส้นเดี่ยวและถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) โดยอาศัยความสามารถของ ดีเอ็นเอ ตรวจสอบที่สามารถเข้าสู่หรือจับกับกับสาย ดีเอ็นเอ เป้าหมายตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (DNA hybridization) กันได้

นอกจากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้างต้นแล้ว ยังมีลักษณะลำดับดีเอ็นเอบางบริเวณที่มีคุณสมบัติในการใช้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งสามารถแยกสิ่งมีชีวิตได้ลึกกว่าระดับสปีชีส์ กล่าวคือ กระบวนการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญได้แก่ การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพโดยการศึกษาความหลากหลายชนิดของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม และการติดตามการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางชีวภาพในแต่ละพื้นที่ ทั้งสองขั้นตอนสำคัญนี้ต้อง

เกี่ยวข้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้อง ซึ่งผู้ที่ทำหน้าที่นี้ได้เป็นอย่างดีคือนักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญในการระบุสิ่งมีชีวิตเฉพาะกลุ่ม อย่างไรก็ตาม การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้องสามารถกระทำได้รวดเร็วและยังคงถูกต้องแม่นยำ แนวคิดของการใช้ลำดับดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์จำเพาะต่อสปีชีส์ในการระบุชนิดเกิดขึ้นจากการสังเกตเห็นประโยชน์เมื่อประยุกต์ใช้ในเชิงอนุรักษ์ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

## 2.7 เทคนิคทางชีวโมเลกุล

การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอ สายใหม่จาก ดีเอ็นเอ ต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ ดีเอ็นเอ สายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Charm Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือสามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอนุชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง ดีเอ็นเอติดตาม(DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน(point mutations and deletions) เป็นต้น

### เครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ ตั้งโปรแกรมการทำงานได้ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5 - 5 ชั่วโมง

เท ค น ิ ค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือ อี ก ชื่ อ ว่า *In vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ที่ ง ลี ช น ิ ค ,

oligonucleotide primers, บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรถูกซ้ำ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90–95 °C ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม และขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทางจาก 5' ไป 3' อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70–75 °C การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

### หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA Polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการดีคลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ปฏิกริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นที่หนึ่ง เรียกว่า Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C

ขั้นที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-23 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60°C

ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA Polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72°C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะถูกควบคุมสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกริยาถูกซ้ำจากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า

## สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอ สายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีสารเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2. DNA Polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

4. PCR Buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม ( $Mg^{++}$ ) อยู่ด้วย

5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือชิ้นส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA Thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตาม โปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

## การวิเคราะห์ผลผลิต ดีเอ็นเอ จากปฏิกิริยา PCR

ดีเอ็นเอ ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหา ดีเอ็นเอ ผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหา ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก ดีเอ็นเอ ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ ดีเอ็นเอ สามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของ ดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอ ที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอุลตราไวโอเล็ตซึ่งจะเห็นแถบ ดีเอ็นเอ เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

ในปัจจุบัน เทคนิคทาง molecular phylogenetics เป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการศึกษาทางชีววิทยา ในหลากหลายสาขา โดยเป็นการอาศัยองค์ความรู้สมัยใหม่ด้านวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ สิ่งมีชีวิตมา ร่วมกับการใช้ข้อมูลทางชีววิทยาเชิง โมเลกุลเช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ หรือลำดับกรดอะมิโนของ สายโปรตีน ในการอธิบายความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในด้านความ หลากหลายทางชีวภาพของ

สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ตลอดจนนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยทั้งด้านชีววิทยาเชิงอนุรักษ์ด้าน วิทยาศาสตร์ การแพทย์ด้านเทคโนโลยีการเกษตร และอีกหลากหลายสาขาของวิทยาศาสตร์ชีวภาพ การอบรมด้าน molecular phylogenetics ในครั้งนี้จึงจะเป็นการให้ความรู้พื้นฐานและการฝึกปฏิบัติที่เกี่ยวข้องกับ molecular phylogenetics เพื่อให้ผู้เข้ารับอบรมได้เข้าใจถึงหลักการสำคัญต่างๆของ molecular phylogenetics และวิธีการในการ วิเคราะห์ข้อมูลทางด้าน molecular phylogenetics ตลอดจนสามารถ สืบหาและเตรียมข้อมูลทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุล เพื่อนำมาวิเคราะห์ทางด้าน molecular phylogenetics เช่น เทคนิคการวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการของ ลำดับดีเอ็นเอและ โปรตีน การสร้างแผนภาพ phylogenetic tree การอนุมานแผนภาพต้นไม้ phylogenetic tree การ ทดสอบทางสถิติแผนภาพ phylogenetic tree ตลอดจนการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree จาก เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีสารสนเทศ (Information technology) หมายถึง กระบวนการต่างๆ และระบบงาน ที่จัดการ ให้ได้สารสนเทศที่ต้องการ มักอยู่ในลักษณะของฐานข้อมูล เช่น ฐานข้อมูลผู้ป่วยใน โรงพยาบาล ฐานข้อมูลการลงทะเบียนเรียน ของนักศึกษาในมหาวิทยาลัย เป็นต้น ลักษณะของข้อมูล ดิบ ดังกล่าว เมื่อปราศจากการจัดการด้วยกระบวนการทางสารสนเทศ มักจะมีปริมาณมาก ไม่เป็น ระเบียบและยากต่อการเข้าถึง ปัจจุบัน การศึกษาทางชีววิทยาปัจจุบันในระดับโมเลกุล นักวิจัยทั่วโลก ที่ ทำงานทางอนุชีววิทยาก็มีเป็นจำนวนมาก ทำให้ข้อมูลการวิจัย ปริมาณมหาศาลถูกผลิตขึ้นในแต่ละ วันไม่รู้จบสิ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้ก็ต้องการวิธีการและระบบจัดการที่ดีเช่นกัน

## 2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนจากสาย โพลีเปปไทด์หลายๆ สายของ ทั้งหมดหรือส่วนหนึ่งของสาย โพลีเปปไทด์ (alignment) เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนาย โครงสร้าง โปรตีน บริเวณที่จัดเรียงกันกันได้ดีที่สุดในโครงสร้าง จะมีการแสดงผลออกมาโดยการทำงานของ โปรแกรมซึ่งกำหนดค่า โดยผู้ใช้ การจัดเรียงที่ดีที่สุดนั้นมักเป็นการพยายามที่จะทำให้ ทั้งจำนวนของ ช่องว่างและลำดับกรดอะมิโนหรือดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (mismatch) มีค่าน้อยที่สุด (เจษฎา เคนดวง บริพันธ์, 2545) การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากการจัดเรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์ เป็นประโยชน์ ต่อการทำงานทางชีวโมเลกุลมาก ทางด้านการวิเคราะห์หายีน โครงสร้างของยีน เช่น ส่วนที่ทำหน้าที่ ควบคุมการทำงานของยีน (regulatory elements) ส่วนที่จะ ทำการแปลรหัสเพื่อให้ได้โปรตีน (coding sequence) ซึ่งสามารถ ประยุกต์ใช้ได้ในการบวนการโคลนเพื่อการสร้างโปรตีนลูกผสม ใหม่ๆ ขึ้น หรือแม้กระทั่งการจัดจำแนกและชี้เฉพาะสปีชีส์ของ สิ่งมีชีวิต โดยเทียบความคล้ายคลึงจากลำดับเบส และสร้าง แผนภาพต้นไม้ไม่แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตขึ้นมา เป็นต้น สำหรับในงานทางด้าน โปรตีน มักเป็นการทำงานที่ เกี่ยวกับการเปรียบเทียบ โครงสร้างสามมิติของโปรตีน วิธีการที่ง่ายที่สุด

ประกอบด้วย การเทียบบริเวณหนึ่งบริเวณ หรือมากกว่าของโปรตีนเดียวกันแต่มาจากแหล่งที่มาที่ต่างกัน สามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ได้เช่น

1. ความเหมือนหรือความต่างระหว่างการทำนาย โครงสร้างผลึก (crystal structure) ของสองลำดับกรดอะมิโน ที่อิสระต่อกัน
2. ความเหมือนหรือความต่างระหว่างภายในกลุ่มของ โครงสร้างหนึ่งๆ ซึ่งมักจะได้มาด้วยการวิเคราะห์ NMR spectroscopy
3. ความเหมือนหรือความต่างระหว่างโครงสร้างที่ได้ มาจากการใช้ข้อมูลทาง X-ray diffraction และ NMR spectroscopy
4. ความเหมือนหรือความต่างที่เกิดขึ้นระหว่าง อะโป- (apo-) หรือ ฮาโล- (halo-) โปรตีน
5. การเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างโปรตีนที่เกิดขึ้นเมื่อมีการ จับกับลิแกนด์ (ligand) โคแฟกเตอร์ (cofactor) หรือโลหะ

โปรแกรมเปรียบเทียบ โครงสร้างโปรตีนคู่เหมือนส่วนใหญ่ มักถูกออกแบบเพื่อให้มาเทียบ โครงสร้างโปรตีนคู่เหมือน (homologous protein) ที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน มีโปรแกรม จำนวนมากมายและมีหลายยุทธวิธีที่ใช้กันในปัจจุบัน ในบทความนี้ จะขอยกตัวอย่างโดยสังเขป เพื่อประกอบความเข้าใจเท่านั้น ตัวอย่างที่ยกมานี้เป็นเพียงหลักการเบื้องต้นของการทำงานที่ นักอณูชีววิทยาใช้ในงานวิจัย โดยส่วนใหญ่กระบวนการนี้มี สองแบบ 1. สำหรับการประยุกต์เพื่อ วัตถุประสงค์เชิงวงศาคาน วิวัฒนาการหรือที่เรียกกันว่าวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogeny) จำเป็นที่ จะต้องสนใจจำนวนข้อมูลที่จะนำมาเทียบ วัตถุประสงค์ก็ เพื่อที่จะเพิ่มความเป็นไปได้ระหว่างการจัด เรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน (alignment of nucleotide or amino acid sequence) ที่ ใกล้เคียงกันที่ใกล้เคียงความจริง และเพื่อลดความ คลาดเคลื่อนทางสถิติให้มากที่สุดเช่นกัน 2. สำหรับงานที่ต้องการหาโปรตีนที่ใกล้เคียงกับข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ นักวิทยาศาสตร์มักจะ ใช้โปรแกรมที่ สามารถทำการเทียบลำดับ โดยหาบริเวณที่เหมาะสมได้โดย อัลกอริทึม โดยโปรแกรม จะทำการเลือกบริเวณการเริ่มเทียบโดย อัลกอริทึมได้ทันที เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติหรือโครงสร้าง ของ โปรตีนที่ต้องการศึกษากับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

## 2.9 ชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

เป็นศาสตร์เรียนรู้ด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงใหม่ ที่จะเป็นวิชาการแขนงหนึ่งซึ่งมีความสำคัญมากที่สุด ในการศึกษาวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตในศตวรรษที่ 21 ผู้เชี่ยวชาญหลายท่าน ถึงกับกล่าวไว้ว่าศาสตร์แขนงชีววิทยาในยุคใหม่นี้ จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบจาก purely lab-based science ไปเป็น information science และแนวโน้มดังกล่าวก็เริ่มปรากฏให้เห็นเป็นรูปธรรมมากขึ้นในขณะนี้

ชีวสารสนเทศศาสตร์พัฒนาจากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพด้านจีโนม จีโนมิกส์และโปรตีโอมิกส์ ประกอบกับพัฒนาการของวิทยาการทางด้านคอมพิวเตอร์และระบบฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ พืช สัตว์ และมนุษย์ ข้อมูลดังกล่าวมีอยู่มากมายมหาศาล ก่อให้เกิดการพัฒนากระบวนการเก็บข้อมูล การวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนการแปลผลจากข้อมูล โดยการผสมผสานกับงานวิจัยทางด้านคณิตศาสตร์ ด้านสถิติ และวิทยาการคอมพิวเตอร์ยุคใหม่ที่พัฒนาก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน

ข้อมูลทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) อย่างเช่น ข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมต่างๆ, ข้อมูลลำดับรหัสของโปรตีนชนิดต่างๆ, ข้อมูลปริมาณของชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ รวมถึงระดับการแสดงออกของยีน (gene) ต่าง ๆ อย่างพวกข้อมูลของ mRNA และโปรตีนที่ได้จากยีน (gene) นั้น ๆ, และข้อมูลหมายเหตุต่างๆ (annotation data) โดยจะเอาข้อมูลเหล่านี้ไปทำการจัดเรียงลำดับรหัสของโปรตีน การจัดโครงสร้างของโปรตีน การทำนายโครงสร้างของโปรตีน การค้นหาสืบค้นยีน (gene) หรือ การสร้างแบบจำลองทางวิวัฒนาการต่างๆ เป็นต้น เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้มีจำนวนมากและมีความซับซ้อนมาก หากศึกษาชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) จะทำให้การจัดเก็บ สืบค้น และประมวลผลข้อมูลต่างๆเหล่านี้ได้สะดวกและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

##### 1. การสกัดดีเอ็นเอ

1.1 นำใบมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง  $-20^{\circ}\text{C}$

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอชุด RBC

สารเคมีในชุดสกัดดีเอ็นเอ

1. GPI buffer =25ml
2. GPXI buffer =25ml
3. GP2 buffer =6ml
4. GP3 buffer =15ml เติม 30 ml isopropanol หรือ propanol ลงใน GP3 buffer
5. W1 buffer =25ml
6. Wash buffer =25ml เติม 50 ml ethanol (96-100%) ลงใน Wash buffer
7. Elution buffer =30 ml (อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน)
8. RNase A 275ul
9. Filter column (หัวกรองสีขาว) 50 ชิ้น
10. GD column (หัวกรองสีเขียว)
11. 2 ml collection tube 100 ชิ้น

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืช

1. ชั่งใบพืชสดหรือใบพืชแช่แข็ง 50-100 mg (ถ้าเป็นใบแห้งใช้ 5-100 mg) หั่นหรือสับเป็นชิ้นเล็กๆ บดกับไนโตรเจนเหลว จนเป็นผงละเอียด ตักใส่หลอด 1.5 ml
2. เติม GPI (หรือ GPXI) 400  $\mu\text{l}$  และ RNase A 5  $\mu\text{l}$  ลงในหลอดทดลอง 1.5 ml นำไปปั่นบน vortex
3. นำไปอุ่นใน 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (กลับหลอดทุก 5 นาที)
4. เติม GP2 100  $\mu\text{l}$  นำไปปั่นบน vortex
5. นำไปแช่น้ำแข็ง 3 นาที
6. ใส่ Filter column (หัวกรองสีขาว) ลงใน 2 ml collection tube เตรียมไว้
7. นำสารละลายจากข้อ 5 (อยู่ในหลอดทดลอง 1.5ml) เทลงใน Filter column ที่เตรียมไว้
8. นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
9. ทิ้ง Filter column เทสารละลายที่ได้ใส่ หลอด 1.5 อันใหม่

### ขั้น DNA binding

10. เติม GP3 (ซึ่งเติม isopropanol แล้ว) จำนวน 1.5 เท่าของสารที่กรองได้ เช่น สารที่กรองได้ 500  $\mu$ l ให้เติม GP3 จำนวน 750  $\mu$ l (รวมเป็น 1,250  $\mu$ l) เป็นต้น นำไปปั่นบน vortex เป็นเวลา 5 วินาที
11. ใส่หลอด GD column (หัวกรองสีเขียว) ลงใน 2 ml collection tube อันใหม่ เตรียมไว้
12. คูดสารละลายในข้อ 10 ประมาณ 700  $\mu$ l ลงใน GD column ส่วนที่เหลือ (~550  $\mu$ l) ใช้ทำ ข้อ 15
13. นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
14. ทิ้งเฉพาะสารละลายที่อยู่ใน collection tube นำ GD column ใส่กลับลงใน collection tube อันเดิม
15. ทำซ้ำข้อ 12-14 โดยนำสารละลายจากส่วนที่เหลือใช้ในข้อ 10 (หรือข้อ 12) (~550  $\mu$ l) เติมลงใน GD column นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งเฉพาะสารที่อยู่ใน collection tube อันเดิมอีกครั้ง

### ขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอ

16. เติม W1 buffer จำนวน 400 ลงใน GD column
17. นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
18. เทสารละลายใน collection tube ทิ้งลงใน collection tube อันเดิม
19. เติม Wash buffer ที่เติม ethanol แล้วจำนวน 600  $\mu$ l ลงใน GD column
20. นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที
21. เทสารละลายใน collection ทิ้งไปนำ GD column ใส่กลับลงใน collection tube อันเดิม
22. นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้สารลงบน GD column (ethanol 96-100%) ลงใน GD column แทน buffer)
23. นำ GD column ที่แห้งวางลงในหลอด 1.5 ml อันใหม่ (ต้องตัดฝาทิ้งก่อน)

### ขั้น DNA Elution

24. เติม preheated Elution buffer (อุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส) จำนวน 100  $\mu$ l ลงตรงกลางของ GD column และทำการละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 ml ที่ถูกตัดฝา
25. ตัดทิ้งไว้ 3-5 นาที (เพื่อให้ Elution buffer ซึมซับไปทั่วกลางของ GD column และทำการละลาย DNA ออกมา) นำไปปั่น 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้ง GD column ไปได้สารละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 ml ที่ถูกตัดฝา

26. ถ่ายสารละลาย DNA ในหลอด 1.5 ml ที่ถูกตัดฝาลงในหลอด 1.5 อันใหม่ หรือหลอด PCR ปิดฝาให้สนิท รััดด้วย Para film ให้แน่น ใส่ถุงพลาสติก ชนิดแซ่แข็ง ติดฉลากให้เรียบร้อย นำไปแช่ในตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

## 2. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

2.1 วิธี Gel electrophoresis ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบความสว่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) 1.0 % agarose gel นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง

2.2 วิธีวัดการดูดกลืนแสง วัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ} = 50 \times A_{260} \times \frac{\text{ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด } (\mu\text{l})}{\text{ปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ } (\mu\text{l})}$$

ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอหาจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ควรมีอัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่

## 3. การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1 การหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทดสอบใช้ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 10 พันธุ์ โดยทดสอบจากปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่ปริมาณ 50 นาโนกรัม เป็นแม่แบบ โดยเลือกไพรเมอร์ 1 เส้น เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี และนำผลผลิตของอาร์เอพีดีมาตรวจสอบผลด้วย 1.5 % agarose gel

3.2 ตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์มาทดสอบกับดีเอ็นเอหนึ่งตัวอย่าง เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และทดลองปรับเปลี่ยนสถานะในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ส่วนประกอบของสารละลาย	ปริมาตรต่อหลอด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. DNA templat (50 ng/ $\mu$ l)	1	50 ng
2. Buffer (10 เท่า)	1.5	1.0 เท่า
3. $MgCl_2$ (50 mM)	7.5	2.5 mM
4. dNTP (10 mM)	0.3	200 $\mu$ M
5. Primer (4 $\mu$ M /100 $\mu$ l)	1.2	2.0 $\mu$ M
6. <i>Taq</i> DNA polymerase (2U/ $\mu$ l)	0.25	0.5 U/15 $\mu$ l
7. ddH <sub>2</sub> O ปลอดเชื้อ	10	-
รวม	15	-

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ให้เข้ากันในหลอดสำหรับ PCR และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยมีรายละเอียดของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 predenature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ	
ขั้นที่ 2 denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที	} จำนวน 35 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
ขั้นที่ 3 final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ	

เก็บสารละลายผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปตรวจสอบผลบน 1.5% agarose gel

3.3 นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 2

3.4 ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.2%

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ลำดับที่	ไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จากปลาย 5' ไปยัง 3'
1	F	5' GCTGCGGAATCTTCTACTGG 3'
	R	5' CCAAAGATCTCGGTCAAAGC 3'
2	F	5' GACAACGTGTGGACCGATG 3'
	R	5' CCCCAAGGGTGTCTAAAGT 3'
3	F	5' GACAACGTGTGGACCGATG 3'
	R	5' ATCGCGTCCTTCATTACGAG 3'

### 3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เตรียมสารละลายสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า (KCl 50 มิลลิโมลาร์; Tris-HCl, pH 9.0 10 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-100 0.1%) MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ TaqDNA polymerase จำนวน 1 ยูนิต และจีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Swift.Maxfro.Thermal Cyclers,ESCO,Singapore) ตั้งโปรแกรม ดังนี้

- ขั้นที่ 1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที
- ขั้นที่ 3 Primer annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที
- ขั้นที่ 4 Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- ขั้นที่ 5 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

ปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ ปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. สารละลายดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร
2. คู่ไพรเมอร์ (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร
3. 2 mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร
4. 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร
5. Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร
6. น้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 12.5 ไมโครลิตร

### 3.2 การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วย agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมลงในช่อง agarose gel ที่ละตัวอย่างจนครบ และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA /HindIII (บริษัท SibEnzyme, Russia) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ทราบขนาดและปริมาณที่แน่นอนเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที นำไปตรวจผลบนเครื่องฉาย UV (UV Transilluminator) และบันทึกภาพการเรืองแสงของดีเอ็นเอด้วยกล้อง polaroid camera โดยทั่วไป การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์หากชิ้นยีนมีขนาดใหญ่ 500 - 1,00 bp มักเตรียม agarose gel ให้มีความเข้มข้นที่ประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากการทดลองนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 200 bp และ 246 bp การตรวจสอบจึงต้องใช้ความเข้มข้นของ agarose gel ให้มากขึ้นเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นของ agarose gel ที่มีค่าสูง ช่องว่างระหว่างโมเลกุลในเนื้อสารจะยิ่งมีค่าลดลง จึงทำให้ดีเอ็นเอที่ยังมีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปตามแรงดันกระแสไฟฟ้าได้ลดลง ในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะยังคงสามารถเคลื่อนผ่าน ช่องว่างระหว่างโมเลกุลของ agarose gel ได้ ด้วยเหตุนี้ การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย electrophoresis บน agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้ดีขึ้น

### 4. การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลาย หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (per locus average) ของแอลลีลที่ประกอบด้วย averaged number of alleles ( $N_a$ ), effective number of alleles ( $A_e$ ) และ allelic richness ( $R$ ) และรวมถึงค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ทั้งค่าสังเกต (observed heterozygosity,  $H_o$ ) และค่าคาดคะเน (expected heterozygosity,  $H_e$ ) และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ในแต่ละประชากร โดยการวิเคราะห์ ณ แต่ละตำแหน่งที่มีความหลากหลายแบบทางพันธุกรรม (polymorphic locus) ด้วยวิธี likelihood ratio test (Yeh *et al.*, 1999) และวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยวิธี Chi-square test ตรวจวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของทุกประชากร โดยจะปรับจีโนไทป์และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กใหม่ ณ ตำแหน่งและประชากรที่ตรวจพบ null allele คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของ Nei (1978) พร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (dendrogram) ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 1.2 (Goudet, 1995) และ

POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) ยกเว้นการวิเคราะห์ null allele และปรับจีโนมไทป์ใช้โปรแกรม Micro-Checker version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004)

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) โดยระบุกลุ่มประชากรตามที่ปรากฏในโครงสร้างความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ได้ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างให้ครอบคลุมทุกระดับที่ปรากฏในโครงสร้าง โดยตรวจสอบจากค่า F-statistics (inbreeding coefficients หรือ fixation indexes) ซึ่งคำนวณจากค่า variance components แล้วทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่า  $P$  ในทุกระดับ และทุกคู่ประชากร ของการตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญของค่า  $P$  ที่ 0.02 (Fu, 1997; Excoffier *et al.*, 2006) การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างคู่ประชากรทุกคู่ ใช้การวิเคราะห์ค่า  $P$  ของ  $F_{st}$  ระหว่างคู่ประชากร ( $PF_{st}$ ) และวิธี exact test ( $P_{exact}$ ) ภายใต้ระดับนัยสำคัญของค่า  $P$  ที่ได้รับการปรับ โดยใช้ Bonferroni correction เพื่อความถูกต้องสำหรับการทดสอบแบบ multiple tests (Rice, 1989) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.1

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 1. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบของมะม่วงน้ำดอกไม้จำนวน 5 ต้น เมื่อตรวจสอบผลบน 1.0 % agarose gel ที่ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide เมื่อวัดเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในขั้นตอน PCR ต่อไป และจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอสามารถหาค่าเข้มข้นได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ $\mu$ l)

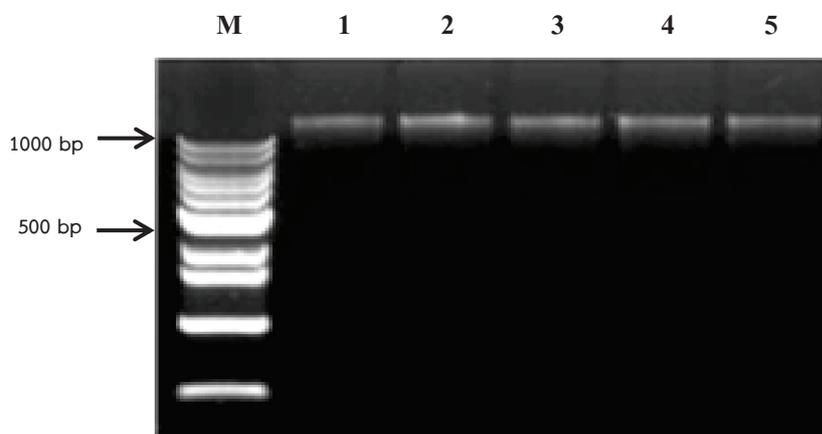
ต้นที่	ความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ $\mu$ l)			
	สกัดครั้งที่	1	2	3
1		810.0	857.6	742.0
2		741.2	733.3	629.4
3		638.7	611.5	661.2
4		711.2	689.2	622.0
5		451.2	588.3	493.6

หลังจากการสกัดดีเอ็นเอ หาค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm และหาค่าความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) หากดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ที่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งจากการตรวจสอบดังกล่าวได้ค่าสัดส่วนระหว่าง  $A_{260}/A_{280}$  ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า  $A_{260}/A_{280}$  ของใบมะม่วงน้ำดอกไม้

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ )				
ซ้ำที่	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
ครั้งที่				
1	2.0	1.9	1.6	1.83
2	1.7	1.8	2.1	1.86
3	1.7	1.9	1.6	1.73
4	1.8	1.7	1.8	1.76
5	1.6	1.9	1.9	1.80

เมื่อวัดค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแล้ว นำมาตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟเรซิส และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Spectrophotometer เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ หากจีโนมิกดีเอ็นเอมีความสมบูรณ์ ไม่แตกหักเสียหายมากนัก ดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะรวมตัวกันอยู่บริเวณด้านบนของเจลและมักไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลลงไปยังด้านล่างได้มากนัก การสกัดดีเอ็นเอของพืชควรเลือกใบอ่อนของพืช เพราะเป็นแหล่งของดีเอ็นเอที่แท้จริง และสอดคล้องกับการทดลองของ Michiels และคณะ (2003) ที่ได้ศึกษาการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบของพืชโดยการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของใบอ่อนและใบแก่ พบว่า ใบพืชอ่อนจะมีองค์ประกอบของสารประกอบประเภทพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) และพอลิฟีนอลิก (polyphenolic compounds) น้อยกว่าใบแก่ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะมีผลต่อปฏิกิริยากับโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้สารประกอบพอลิแซคคาไรด์และพอลิฟีนอลิกยังมีผลในการยับยั้งดีเอ็นเอในขั้นตอนการสกัดอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Lim และคณะ (1997) ภายหลังจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล พบว่า ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยและอาจมีการปนเปื้อนของสารทุติยภูมิ (secondary metaboliti) หรือสารพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีอยู่ในพืช จากดีเอ็นเอที่สามารถนำมาตรวจสอบโดยวิธีการเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟเรซิส ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ บน 1.0 % agarose gel

- หมายเหตุ Lane M คือ 100 bp DNA Maker  
 Lane ที่ 1 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 1  
 Lane ที่ 2 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 2  
 Lane ที่ 3 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 3  
 Lane ที่ 4 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 4  
 Lane ที่ 5 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 5

## 2. ผลการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

### 2.1 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของมะม่วงน้ำดอกไม้

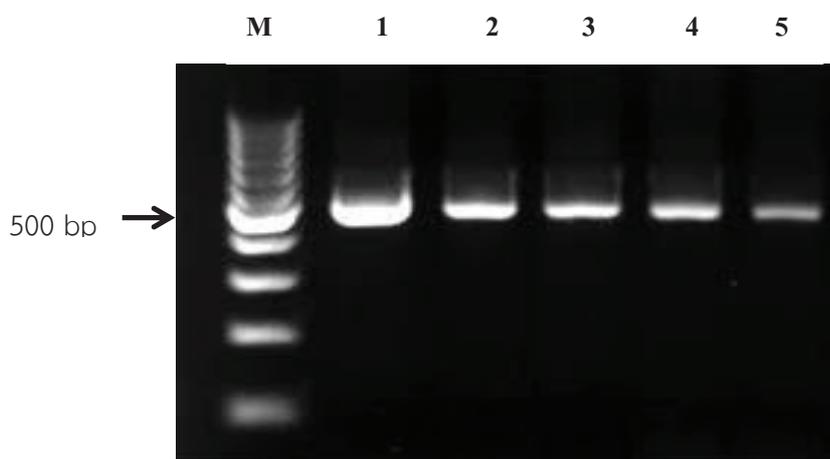
ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกันตามความสามารถของไพรเมอร์แต่ละคู่สามารถเข้าจับกับจีโนมิกดีเอ็นเอของมะม่วงในแต่ละตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ มีจำนวนทั้งหมด 3 คู่ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะม่วงน้ำดอกไม้

ลำดับที่	ไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จาก ปลาย 5' ไปยัง 3'
1	F	5' GCTGCGGAATCTTCTACTGG 3'
	R	5' CCAAAGATCTCGGTCAAAGC 3'
2	F	5' GACAACGTGTGGACCGATG 3'
	R	5' CCCCAAGGGTGTCTAAAGT 3'
3	F	5' GACAACGTGTGGACCGATG 3'
	R	5' ATCGCGTCCTTCATTACGAG 3'

### 3. การวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วงน้ำดอกไม้ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เมื่อตรวจสอบด้วย 1.0% agarose gel พบไพรเมอร์ทุกเส้นที่ใช้ทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วงน้ำดอกไม้ได้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงน้ำดอกไม้จากไพรเมอร์แต่ละเส้นมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์จากดีเอ็นเอมะม่วงน้ำดอกไม้ บน 1.5 % agarose gel  
 หมายเหตุ Lane M คือ 100 bp DNA Maker  
 Lane ที่ 1 คือ PCR Product จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 1

Lane ที่ 2 คือ PCR Product จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 2

Lane ที่ 3 คือ PCR Product จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 3

Lane ที่ 4 คือ PCR Product จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 4

Lane ที่ 5 คือ PCR Product จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ต้นที่ 5

เมื่อได้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เรียบร้อยแล้ว นำตัวอย่างที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท วอร์ด เมดิก เพื่อส่งวิเคราะห์ผลต่อไปที่ บริษัท First BASE Laboratories ประเทศสิงคโปร์ ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลได้ลำดับดีเอ็นเอดังนี้ คือ

```
AACTCCTCAACCTGGAGTTCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTAC
ATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGA
GCCCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGT
TCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCT
AGAGGATCTACGAATCCCTACCGCGTATATAAAAACCTTCCAAGGACCACCGCATGGGATCCAAGTTGA
GAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCTTATTGGGATGTACTATTAAACCGAAATTAGGTTTATCC
GCTAAGAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGACTTTACCAAAGACGAT
```

รูปที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาด 484 นิวคลีโอไทด์

#### 4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการด้วยยีน *rbcl*

จากเหตุผลดังกล่าว จึงต้องมีการศึกษาการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ร่วมกับการจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของต้นมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับสปีชีส์และยังสามารถจำแนกได้ลึกกว่าระดับสปีชีส์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ศึกษายีน *rbcl* หรือ Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylaseoxy Genase ซึ่งเป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) เอนไซม์ RubisCO ที่สมบูรณ์ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และขนาดเล็กรวมตัวกัน จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO<sub>2</sub> ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis & Soltis, 1998) ความยาวของยีน *rbcl* มีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้าง DNA barcode จะ

ใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาวตั้งแต่ 500-700 คู่เบส (Kress & Erickson, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Ebihara *et al.*, 2010) จุดเด่นของยีน *rbcL* ที่ CBOL Plant Working Group พิจารณาว่าเหมาะสำหรับเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานคือ มีความเป็นมาตรฐานสากล และให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีมาก จากการศึกษาดังกล่าว จึงได้นำข้อมูลข้างต้นมาใช้ในการร่วมกันในจำแนกมะม่วงน้ำดอกไม้ในแต่ละพันธุ์ปลูกเพื่อแสดงถึงลักษณะการมีความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการ

##### 5. การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> และได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไฟล์แบบ FASTA format จากมะม่วงอีก 5 พันธุ์ปลูก ได้แก่ มะม่วงอกร่อง, มะม่วงแก้ว, มะม่วงเขียวเสวย, มะม่วงหนองแขง และมะม่วงโชคอนันต์ ดังแสดงต่อไปนี้

###### มะม่วงอกร่อง

```
TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGACTTAT
TATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAG
TTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGA
CCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAGCCCCTTGCTGGAGAAG
AAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTT
ACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTAGAGGATCTACGAATCC
CTACCGGTATATAAAAACCTTTCCAAGGACCACCGCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACA
AGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCGAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAG
AGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGACTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACC
ATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTA
```

###### มะม่วงแก้ว

```
TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGACTTAT
TATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAG
TTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGA
CCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAGCCCCTTGCTGGAGAAG
AAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTT
ACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTAGAGGATCTACGAATCC
```

CTACCGCGTATATAAAAACCTTTCCAAGGACCACCGCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACA  
 AGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCGAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAG  
 AGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGACTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACC  
 ATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTA

#### มะม่วงเขียวเสวย

TCACCACAAACAGAAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGACTTAT  
 TATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAG  
 TTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGA  
 CCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAGCCCCTTGCTGGAGAAG  
 AAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTT  
 ACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTAGAGGATCTACGAATCC  
 CTACCGCGTATATAAAAACCTTTCCAAGGACCACCGCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACA  
 AGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCGAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAG  
 AGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGACTTTACCAAAGACGATAAGAACGTGAACTCCCAACC  
 ATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTA

#### มะม่วงหนองแขง

TCACCACAAACAGAAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGACTTAT  
 TATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAG  
 TTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGA  
 CCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAGCCCCTTGCTGGAGAAG  
 AAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTT  
 ACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTAGAGGATCTACGAATCC  
 CTACCGCGTATATAAAAACCTTTCCAAGGACCACCGCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACA  
 AGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCGAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAG  
 AGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGACTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACC  
 ATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTA

#### มะม่วงโชกอนันต์

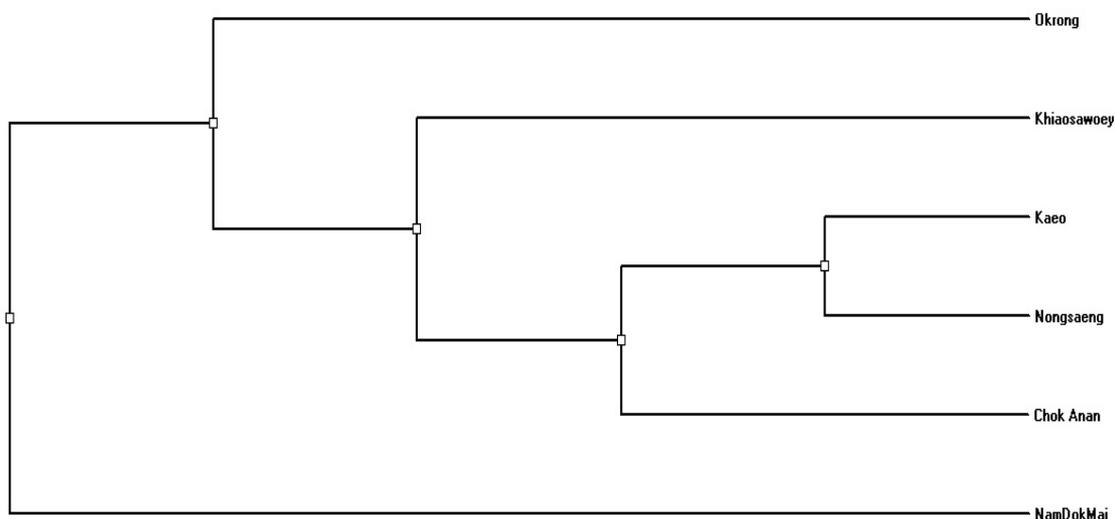
TCACCACAAACAGAAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGACTTAT  
 TATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAG

TTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGA  
 CCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAGCCCCTTGCTGGAGAAG  
 AAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTT  
 ACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTAGAGGATCTACGAATCC  
 CTACCGCGTATATAAAAACCTTTCCAAGGACCACCGCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACA  
 AGTATGGCCGTCCTTATTGGGATGTACTATTAACCGAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAG  
 AGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGACTTTACCAAAGACGATGACAACGTGAACTCCCAACCA  
 TTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTA

### มะม่วงน้ำดอกไม้

TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGACTTAT  
 TATACTCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCTGGAG  
 TTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGA  
 CCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAGCCCCTTGCTGGAGAAG  
 AAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTT  
 ACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTAGAGGATCTACGAATCC  
 CTACCGCGTATATAAAAACCTTTCCAAGGACCACCGCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACA  
 AGTATGGCCGTCCTTATTGGGATGTACTATTAACCGAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAG  
 AGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGACTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACC  
 ATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTA

จากข้อมูลพบว่ามะม่วงน้ำดอกไม้เมื่อเทียบกับมะม่วงพันธุ์อื่น พบว่า มีลำดับที่ค่อนข้างห่างจาก  
 มะม่วงพันธุ์อื่นๆ ซึ่งเทียบได้จากค่า genetic distant เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกัน โดยใช้  
 โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 ในการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *rbcL* ระหว่างพันธุ์ปลูกมะม่วง  
 น้ำดอกไม้ข้างต้น ใช้โปรแกรม CLUSTAL X (1.83) ในการทำ multiple alignment และใช้โปรแกรม  
 Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1 ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 30 ซึ่งเมื่อ  
 พิจารณาความสัมพันธ์ที่มีความใกล้ชิดกันของมะม่วงน้ำดอกไม้ในไอโซเลตต่างๆ จะเห็นได้ว่า มะม่วงแต่  
 ละพันธุ์มีค่า genetic distant ดังนี้คือ มะม่วงอกร่อง = 0.00225, เขียวเสวย = 0.00236, แก้ว = 0.00000,  
 หนองแขง = 0.00034, F= โขคอนันต์ = 0.00034 และ น้ำดอกไม้ = 2.72575 ซึ่งจากค่าดังกล่าว ค่าที่ได้หาก  
 ยิ่งมีค่ามาก แสดงว่า สิ่งมีชีวิตนั้นมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสิ่งมีชีวิตที่เปรียบเทียบกับค่อนข้างน้อย  
 ซึ่งจะเห็นได้ว่า มะม่วงน้ำดอกไม้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมค่อนข้าง  
 น้อยเมื่อเทียบกับมะม่วงพันธุ์ปลูกอื่นๆ ดังแสดงจากการสร้าง Phylogenetic tree ดังรูปที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการของมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1

หมายเหตุ:      Okrong            = มะม่วงอกร่อง  
                          Khiaosawoey    = มะม่วงเขียวเสวย  
                          Nongsaeng        = มะม่วงหนองแซง  
                          Chok Anan        = มะม่วงโชคอนันต์  
                          NamDokMai       = มะม่วงน้ำดอกไม้

จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะม่วงน้ำดอกไม้จำนวน 6 พันธุ์ปลูกด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* พบว่า มะม่วงแก้วและมะม่วงหนองแซงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากที่สุด และมีความใกล้ชิดกับมะม่วงโชคอนันต์เขียวเสวย อกร่อง และน้ำดอกไม้ ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่นๆ

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะม่วงน้ำดอกไม้จำนวน 5 ต้นและทำการเพิ่มปริมาณยีน *rbcl* ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส และเปรียบเทียบลำดับเบสกับมะม่วงอีก 5 พันธุ์ปลูก ได้แก่ มะม่วงอกร่อง, มะม่วงแก้ว, มะม่วงเขียวเสวย, มะม่วงหนองแซงและมะม่วงโชคอนันต์ พบว่า มะม่วงน้ำดอกไม้ มีลำดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ห่างจากมะม่วงพันธุ์อื่นมากที่สุด ทั้งนี้ หากวิเคราะห์จากลักษณะทั่วไปแล้วมะม่วงน้ำดอกไม้เป็นมะม่วงผลเรียวยาว มะม่วงดิบมีรสเปรี้ยว สุกมีรสหวาน ต่างจากเขียวเสวย หนองแซง โชคอนันต์ที่สามารถทานดิบได้ หากพิจารณาจากผลคล้ายอกร่อง แต่มีลักษณะเมล็ดที่แบนกว่า ซึ่งจากสิ่งดังกล่าว พอสรุปเบื้องต้นว่า มะม่วงน้ำดอกไม้มีลักษณะประจำพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจง หากใช้ส่วนของยีน *rbcl* ในการจำแนกชนิดของมะม่วงที่ไม่ทราบพันธุ์จากตัวอย่างใบ ก็คาดว่าจะสามารถจำแนกมะม่วงน้ำดอกไม้ออกจากมะม่วงชนิดอื่นได้ แต่อย่างไรก็ตาม การจะใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* จัดกลุ่มมะม่วงพันธุ์ดังกล่าว อาจเกิดข้อจำกัดขึ้นบางประการเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเครื่องมือทางโมเลกุลที่ใช้ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความแปรปรวนน้อยในวิธีหนึ่ง แต่กลับมีการเพิ่มปริมาณได้ในบริเวณที่มีความแปรปรวนมากในอีกวิธีหนึ่ง จึงทำให้ผลการทดลองอาจไม่สามารถตอบโจทย์ที่ต้องการทราบได้อย่างชัดเจนนัก ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอ 7 บริเวณในพลาสติกเพื่อประเมินความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ *atpF-atpH* spacer, ยีน *matK*, ยีน *rbcl*, ยีน *rpoB*, ยีน *rpoC1*, *psbK-psbI* spacer และ *trnH-psbA* spacer เกณฑ์ที่ใช้ประกอบการพิจารณาความเหมาะสมคือ การได้มาซึ่งลำดับดีเอ็นเอ คุณภาพของข้อมูล และความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ จากการศึกษาครั้งนี้ PWG สรุปว่าบริเวณที่เหมาะสมสำหรับจำแนกพืชคือ *rbcl* และ *matK* โดยต้องใช้ข้อมูลจากทั้งสองยีนร่วมกัน ในการระบุชนิดพืช (2-locus barcode) (CBOL Plant Working Group, 2009) อย่างไรก็ตามแม้คณะกรรมการระดับสูงของ CBOL สรุปยืนยันว่า *rbcl* และ *matK* ได้รับความเห็นชอบในการถูกกำหนดให้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชบก แต่คณะกรรมการยังคงเห็นควรว่าการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณอื่นสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะยังเป็นประโยชน์ในการเป็นข้อมูลสำรองสำหรับความต้องการในบางกรณีที่มีข้อมูลจาก *rbcl* และ ไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกสปีชีส์พืชบางกลุ่ม (CBOL, 2009)

สำหรับในกลุ่มพืช ยังไม่สามารถระบุบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode ได้แน่นอน ตัวอย่างการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับดีเอ็นเอที่ควรใช้เป็น DNA barcode ได้แก่ ในปี ค.ศ 1999 Hilu และ Alice ได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Poaceae โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *matK* พบว่ายีนนี้ ถอดรหัสให้กรดอะมิโนจำนวนไม่เท่ากันใน และพบการเพิ่มหรือการขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณ

อนุรักษ์ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาบริเวณอื่น เช่น ยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS โดย Chase และคณะ (2005) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับเบสของยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS จะเป็นข้อมูลที่ดี และมีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genebank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพื้นที่บางกลุ่ม และพบยังว่ายีน *matK* มีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่น เช่น สูงกว่ายีน *rbcl* 2-3 เท่า ทำให้มีตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์มากกว่า จึงทำให้เหมาะสมในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและชนิด และน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์ ในเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 จัดที่ New York Botanical Garden ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *matK* น่าจะเป็นบริเวณหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุพืช แต่ยังคงต้องทำการทดสอบเพื่อประเมินศักยภาพสำหรับการใช้งานจริงต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *matK* ในแง่ของการนำมาใช้เป็น DNA barcode ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวนี้ จึงต้องมีการทบทวนและวางแผนเพื่อค้นหาวิธีการในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมและสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะม่วงน้ำดอกไม้ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5 (2): 37-58
- Brown, G., W. N. Frost, and P. A. Getting. 1996. Habituation and iterative enhancement of multiple components of the *Tritonia* swim response. *Behav. Neurosci.* 110:478–485.
- Chase, W. M., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, M.J, Kesanakurthi, P. R., Haidar, N. and Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1889-1895.
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K. M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T. A. j., Conrad, F., Salazar, G. A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M. L., Barraclough, T. G., Kelly, L. and Wilkinson, M. J. 2007. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295-299.
- CBOL Plant working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 106: 12794-12797.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ebihara, A., Nitta, J.H. & Ito, M. 2010. Molecular species identification with rich floristic sampling:DNA barcoding the pteridophyte flora of Japan. *PLoS ONE* 5: e15136.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2006) Arlequin ver. 3.11: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne: Berne, Switzerland
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., Percy, D. M., Hajibabaei, M. and Barrett, S. C. H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3: e2802.

- Ford, C. S., Ayres, K. L., Toomey, N., Haider, N., Stahl, J. V. A., Kelly, L. J., Wikström, N., Hollingsworth, P. M., Duff, R. J., Hoot, S. B., Cowan, R. S., Chase, M. W. and Wilkinson, M. J. 2009. Botanical Journal of the Linnean Society 159: 1-11.
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Gonzalez, M.A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S.A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C. & Chave, J. 2009. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS ONE* 4: e7483.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313-321.
- Hebert P.D.N., Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2(10): e312
- Hilu, K. W. and L. A. Alice. 1999. Evolutionary implications of *matK* indels in Poaceae. *Amer. J. Bot.* 86: 1735-1741.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* 84: 830-839.
- Kochert, G. 1994. RFLP technology. In DNA-based markers in plants. Phillips, R.L. and I.K. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. Pp.8-38.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Papulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G. & Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2923-2928.
- McCouch, S. and S.D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic. In *Rice biotechnology*. Khush, G.S. and Toenniessen, G.H. (eds.) CAB International. Wallingford. Oxon, UK. Pp. 109-133.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., Steeves, R. A. D. and Janovec, J. 2007. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources* 8: 480-490.

- Seberg, O. and Petersen, G. 2009. How many loci does it take to DNA barcode a crocus? PLoS ONE 4: e4598.
- Plunkett, G.M., Soltis, D.E. and Soltis, P.S., 1997, Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on matK and rbcL sequence data, *Amer. J. Bot.* 84: 565-580
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1:215-222.
- Sass, C., Little, D.P., Stevenson, D.M. & Specht, C.D. 2007. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding makers for species identification of cycads. PLoS ONE 2: e1154.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. D.E., Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle (Eds.), pp.1-42. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Patterson, A. H., and Bonierbale, M. W, 1989, RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science, *Bio/Technology* 7:257
- The Royal Botanic Gardens, Kew. 2007. Phase 2 Update. DNA barcoding Available Source: <http://www.kew.org/barcoding/update.html>. June 21, 2007.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM and Shipley PF (2004) MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407–4414
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531–6535
- Yeh Francis C., Yang R.-C., Boyle Timothy B. J., Ye Z.-H. and Mao Judy X. 1999 POPGENE version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

## การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายต้นต่อ CTAB buffer		
1.1 CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ (50 มิลลิลิตร)		
ชั่ง CTAB	5.0	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
1.2 Tris-HCl 1 โมลาร์ (25 มิลลิลิตร)		
ชั่ง Tris base	3.03	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	25	มิลลิลิตร
1.3 EDTA 1 โมลาร์ (20 มิลลิลิตร)		
ชั่ง EDTA	7.44	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
1.4 NaCl 3 โมลาร์ (50 มิลลิลิตร)		
ชั่ง NaCl	8.77	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
2. การเตรียมเอนไซม์ Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
ชั่ง Proteinase K	10	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่น	986.7	ไมโครลิตร
Tris-HCl 1 โมลาร์ (pH 7.5)	10	ไมโครลิตร
NaCl 3 โมลาร์	3.3	
ไมโครลิตร		
บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส		
3. การเตรียมเอนไซม์ RNase A (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
ชั่ง RNase-A	1	มิลลิกรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร
เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส		

## 4. TE buffer (250 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris base	0.303	กรัม
EDTA	0.093	กรัม
เติมน้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

## 5. TBE ความเข้มข้น 10 เท่า (1000 มิลลิลิตร)

Tris base (hydroxyl methyl,aminomethane)	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
EDTA 0.5 โมลาร์ (pH 8.0)	40	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

## 6. เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (70 มิลลิลิตร)

ชั่ง อะกาโรส	0.7	กรัม
ปรับปริมาตรด้วย TBE buffer เข้มข้น 1 เท่า	70	มิลลิลิตร
ต้มจนละลายด้วย hot plate หรือ ไมโครเวฟ		

## 7. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิลิตร)

เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์	95	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

## 8. เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิลิตร)

เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์	70	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

## 9. คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (100 มิลลิลิตร)

เติมคลอโรฟอร์ม	96	มิลลิลิตร
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	4	มิลลิลิตร
เก็บไว้ในขวดสีชา		

## 10. การเตรียม CTAB buffer สำหรับสกัดดีเอ็นเอ (800 ไมโครลิตร)

สารละลายต้นต่อ CTAB buffer	ความเข้มข้นที่ต้องการ	ปริมาณต่อตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
CTAB 10 เปอร์เซ็นต์	2 เปอร์เซ็นต์	160.00
Tris-HCl 1 โมลาร์	100 มิลลิโมลาร์	80.00
EDTA 1 โมลาร์	20 มิลลิโมลาร์	16.00
NaCl 3 โมลาร์	1.4 โมลาร์	373.33
$\beta$ -mercaptoethanol	1.2 เปอร์เซ็นต์	1.60
Proteinase-K 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	8.00
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	-	161.07
รวม	-	800

หมายเหตุ เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

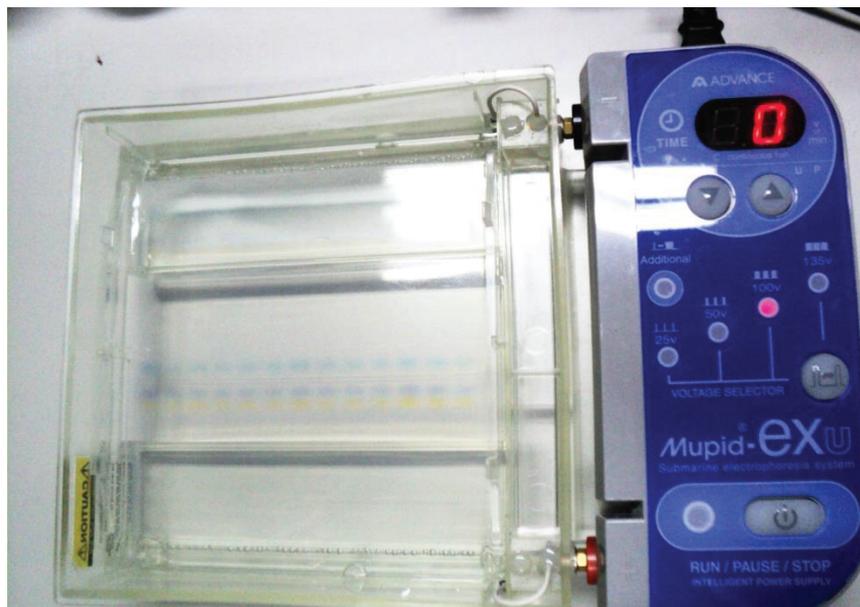
**ภาคผนวก ข**



ภาพที่ 4 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)



ภาพที่ 5 ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)



ภาพที่ 6 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส  
(Mupid-EXU<sup>®</sup> Gel Electrophoresis System)



ภาพที่ 7 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer,  
ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700)



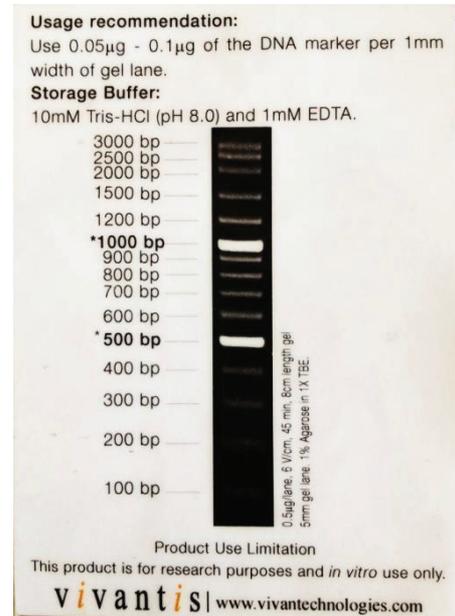
ภาพที่ 8 สารละลายต้นตอที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB



ภาพที่ 9 ชุดสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์  
(FTA™ Plant Kit, What Man, UK)

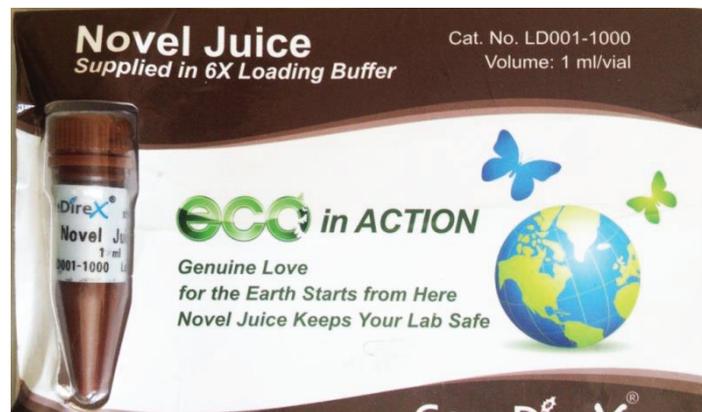


ภาพที่ 10 Agarose gel (Invitrogen™)



ภาพที่ 11 DNA Marker หรือ DNA Ladder

(VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)



ภาพที่ 12 สีซ้อมดีเอ็นเอ (6X Novel juice DNA staining dye, GeneDireX®)

ภาคผนวก ค

remember: this is an unrooted tree!

Between	And	Length	
-----	---	-----	
2		Okrong	0.00225
2		3	0.00034
3		Khiaosawoey	0.00236
3		4	0.00034
4		1	0.00034
1		Kaeo	0.00000
1		Nongsaeng	0.00000
4		Chok Anan	0.00236
2		NamDokMai	2.72575

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI

*Mangifera indica* ribulose-1,5-bisphosphate arboxylase/oxygenase large subunit-like (rbcL) gene

GenBank: GU935433.1

LOCUS GU935433 1411 bp DNA linear PLN 01-MAR-2014

DEFINITION *Mangifera indica* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit-like (rbcL) gene, partial sequence; chloroplast.

ACCESSION GU935433 VERSION GU935433.1 GI:328920369

SOURCE chloroplast *Mangifera indica* (mango)

REFERENCE 1 (bases 1 to 1411)

AUTHORS Muellner,A.N., Pell,S.K., Weeks,A., Clayton,J., Buerki,S., Chang,Y.-C.

TITLE Molecular phylogenetics of the eudicot order Sapindales based on plastid rbcL, atpB and trnL-trnF DNA sequences

JOURNAL Unpublished

AUTHORS Pell,S.K.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-FEB-2010) Science, Brooklyn Botanic Garden, 1000

Washington Ave, Brooklyn, NY 11225, USA

COMMENT GenBank staff are still waiting for submitters to provide appropriate coding region information.

FEATURES Location/Qualifiers

ORIGIN

```

1 agccggcggt aaagactata aattgactta ttactctct gactatataa ccaaagatac
61 tgatatcttg gcagcattcc gagtaactcc tcaacctgga gtccacccg aggaagcagg
121 ggctgcggta gctgcggaat cttctactgg tacatggaca actgtgtgga ccgatgggct
181 taccagcctt gatcgttaca aaggacgatg ctacaacatt gagccccgtg ctggagaaga
241 aaatcaatat atatgtatg tagcttacc ttagacctt ttgaagaag gttctgttac
301 taacatgttt acttcattg tgggtaatgt atttgggttc aaagccctgc gcgctctacg
361 tctagaggat ctacgaatcc ctaccgcgta tataaaaact ttccaaggac caccgatgg
421 gatccaagtt gagagagata aattgaacaa gtagggcct cccctattgg gatgtactat
481 taaaccgaaa ttaggtttat ccgccggtag agctgtttat gaatgtctac gtggtggact
541 tgactttacc aaagacgatg agaacgtgaa ctccaacca ttatgcgtt ggagagaccg
601 ttccctattt tgtgcggaag ctatttagaa agcgcaggct gaaacaggtg aaattaaagg
661 tcattacttg aatgctactg caggfacatg cgaagaaatg ataaaaaggg ctatatttgc
721 aagagagttg agagttccta tcgtaatgca tgactactta acagggggat tcaccgcaaa
781 tactagcttg gctcattatt gccgagataa tggctactt cttcacatcc atcgtgcaat
841 gcatgcagtt attgatagac agaagaatca tggtagcac ttctgttac tagctaaagc
901 ttactgtctg tctggggag atcatttca ctccggtaca gtagtaggta aactgaagg
961 ggaagagac ataacttgg gctttgtga ttactacgt gatgattta ttgaaaaga
1021 tcgaagccgt ggtatttatt tcaactcaaga ttgggtctct ttaccagtg ttctgccctg
1081 ggcttcaggg ggtattcacg ttggcatat gcctgcttg accgagatct ttggagatga
1141 ttccgtacta caatcgggtg gaggaacttt aggacaccct tggggaaatg cgccgggcgc
1201 cgtagctaat cgagtagctc tagaagcatg tgtacaagct cgtaatgaag gacgcgatct
1261 tgctcgcgag ggtaattaaa ttatccgtga ggctagcaaa tggagtcctg aactggctgc
1321 tgctgtgaa gtaggaagg agatccaatt tgaattcga gcaatggata ctttgaatc
1381 cagtaattaa cgtttggttt attagtgaat g

```

FASTA Format

มะม่วงอ่อน

TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGAC  
 TTATTATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCA  
 ACCTGGAGTTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGA  
 CAACTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAG  
 CCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAA  
 GGTTCTGTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTC  
 TACGTCTAGAGGATCTACGAATCCCTACCGCGTATATAAAAACTTTCCAAGGACCACCGCATGGG  
 ATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACC  
 GAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGA  
 CTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTA

**มะม่วงแก้ว**

TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGAC  
 TTATTATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCA  
 ACCTGGAGTTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGA  
 CAACTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAG  
 CCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAA  
 GGTTCTGTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTC  
 TACGTCTAGAGGATCTACGAATCCCTACCGCGTATATAAAAACTTTCCAAGGACCACCGCATGGG  
 ATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACC  
 GAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGA  
 CTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTA

**มะม่วงเขียวเสวย**

TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGAC  
 TTATTATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCA  
 ACCTGGAGTTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGA  
 CAACTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAG  
 CCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAA  
 GGTTCTGTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTC  
 TACGTCTAGAGGATCTACGAATCCCTACCGCGTATATAAAAACTTTCCAAGGACCACCGCATGGG  
 ATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACC  
 GAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGA  
 CTTTACCAAAGACGATAAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTA

**มะม่วงหนองแขง**

TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGAC  
 TTATTATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCA  
 ACCTGGAGTTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGA  
 CAACTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAG  
 CCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAA  
 GGTCTGTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTC  
 TACGTCTAGAGGATCTACGAATCCCTACCGCGTATATAAAAACTTTCCAAGGACCACCGCATGGG  
 ATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACC  
 GAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGA  
 CTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTA

### โศกอนันต์

TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGAC  
 TTATTATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCA  
 ACCTGGAGTTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGA  
 CAACTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAG  
 CCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAA  
 GGTCTGTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTC  
 TACGTCTAGAGGATCTACGAATCCCTACCGCGTATATAAAAACTTTCCAAGGACCACCGCATGGG  
 ATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACC  
 GAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGA  
 CTTTACCAAAGACGATGACAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTA

### มะม่วงน้ำดอกไม้

TCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCCGGCGTTAAAGACTATAAATTGAC  
 TTATTATACTCCTGACTATATAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCA  
 ACCTGGAGTTCCACCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGA  
 CAACTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAG  
 CCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAA  
 GGTCTGTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTC  
 TACGTCTAGAGGATCTACGAATCCCTACCGCGTATATAAAAACTTTCCAAGGACCACCGCATGGG  
 ATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACC  
 GAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTTGA  
 CTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTA

## ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล

นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

Mr. Surachest Aiumsumang

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3679800097588

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ ไปรษณีย์  
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

โทรศัพท์ มือถือ 0899612694

e-mail : tophesun@hotmail.com

## ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ จากคณะ  
เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากคณะ  
วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา สาขา  
ย่อย ชีววิทยาโมเลกุล

## สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีววิทยาโมเลกุล พันธุศาสตร์โมเลกุล

## งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง, ดวงกมล แม้นศิริ. (2554). การใช้วิตามินซีในการส่งเสริมความทนต่อสภาวะ  
เครียดเกลือในมะขาม (*Oryza sativa* L.). ใน: การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับ  
บัณฑิตศึกษาครั้งที่ 12 (สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ). หน้า 544 – 553. บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง, เบญจพร ศรีสุวรรณ. (2557). การแสดงออกของยีนไคตินเนสในการ

ต้านทานโรคราในมะขาม. ในการประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ  
ครั้งที่ 1 สานพลังปัญญา เพื่อพัฒนาสุขภาพ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้สังคมพหุ  
วัฒนธรรม. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

**ประวัติผู้วิจัยร่วม**

**ชื่อ และนามสกุล**

รศ. ดร. เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ

Assoc. Prof. DR.BENCHAPORN SRISUVORAMAS

**หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3101600210787**

**ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9**

**การศึกษาสูงสุด Ph.D สาขาวิชา Horticulture (spect. in Tissue Culture and Genetics)**

**มหาวิทยาลัย UP LOSBANOS ปีที่จบ พ.ศ.2542**

**สถานที่ติดต่อ**

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์

รหัสไปรษณีย์ 67000 โทรศัพท์ 0-5671- 7100 ต่อ 1706 โทรสาร 0-5671-7110

**งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว**

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และจินตนา สนามชัยสกุล.2552. ศึกษาช่วงเวลากการติดเชื้อราและผลของเชื้อราไตรโคเดอร์มา สารสกัดสมุนไพร สารสกัดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ ที่มีต่อเชื้อราจาก มะขามหวานพันธุ์ประกายทองในห้องปฏิบัติการ. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทูลอดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปีการศึกษา 2552.

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาคูลย์ จงรักษ์ นิคม จันทรมังกร และอนุพงษ์ ทิมอุบล. 2552. **ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรพญาวัน(หวานจ็อก) Proceeding.งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 โรงแรมเดอะไทด์ รีสอร์ท (หาดบางแสน)จังหวัดชลบุรี 15-17 ตุลาคม 2552**

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาคูลย์ จงรักษ์ ประยูร ลี้มสุข และ กฤษณีพันธ์ พรรณรัตน์ชัย. 2551.

**The production of high nutritive *Amaranthus spp.* by hydroponic**

**method for the business protocol.Proceeding . ในงานประชุมวิชาการ**

นานาชาติ The International Workshop and Symposium on Science and

Technology 2008(I-SEEC 2008) 15-16 ธันวาคม 2551 ณ โรงแรมรอยัลแม่โจง

หนองคาย ประเทศไทย

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2551.การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรพญาวันโดยการมีส่วนร่วมของผู้ใช้สมุนไพร เพชรบูรณ์:คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์  
ทุนสถาบันวิจัยและพัฒนาประจำปี 2551 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, อาคูลย์ จงรักษ์ ,ประยูร ลี้มสุข และ กฤษณีพันธ์ พรรณรัตน์ชัย .2550.

ศึกษาการผลิตผักโขมที่ปราศจากสารก่อมะเร็ง(แคลเซียมออกซาเลต) โดยวิธีไฮโดร โพนิกส์  
เพื่อเป็นต้นแบบไปสู่ภาคธุรกิจ เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนงบประมาณแผ่นดินโดยผ่านการพิจารณาจาก วช.  
2550

เบญจพร ศรีสุวรรณ.2549. การศึกษาสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสปูดำโดยเทคนิคการ  
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฝังตัวอย่างในพาร์ฟฟิน. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และ  
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและ  
พัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปี 2549

เบญจพร ศรีสุวรรณ.2548.คุณค่าทางอาหารและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแคลลัสผักโขมหนามที่  
ปราศจากสารก่อมะเร็ง. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย  
ราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณ.2547. ศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแคลลัสในผักโขม 3 ชนิด  
(ผักโขมจีน, ผักโขมหนามและผักโขมหัด) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.

ISBN 974-7479-83-4 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย  
ราชภัฏเพชรบูรณ์.ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา  
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปี 2547

เบญจพร ศรีสุวรรณ.2546.ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นแฮพลอยด์(n)จากอับละอองเรณูของ  
ช่อนกลิ้ง. ISBN 974-7479-62-1 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา  
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2546

เบญจพร ศรีสุวรรณ. 2545. การศึกษาคุณค่าทางอาหารของแคลลัสจากมะขามหวาน 4 สาย  
พันธุ์ (ประกายทอง, สีทอง, ศรีชมภู และขันตี). ISBN 974-7479-50-8  
เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.ทุนอุดหนุนการ  
วิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2545

เบญจพร ศรีสุวรรณ และคณะ. 2545. ศึกษาการเพาะเมล็ดแก้วมังกรด้วยเทคนิค Embryo  
Rescue. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณ. 2544. การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานใน  
หลอดแก้ว. ISBN 974-7479-44-3 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา  
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2544

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ. 2526.ความผิดปกติของโครโมโซมในลิมโฟไซท์ของคนเนื่องมาจาก  
วิตามินซี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม) คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, พรทิพย์ พุ่มภาชี, นุจรี เผือกใต้, และ ศุภเกียรติ ประเสริฐสังข์. 2544.  
ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในแคลลัสจากมะขามหวาน 3 สายพันธุ์ (สีทอง,  
ประกายทอง และขันตี). เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบัน  
ราชภัฏเพชรบูรณ์

Benchaporn Srisuvoramas. 1999. **Morphology, Histology and Cytology of  
Enhanced Axillary Bud Formation and Production of Cell Suspension Culture  
in *Theobroma cacao* Linn. in Vitro.** Ph.D. Dissertation . UPLB. Philippines.

## 7. ตำรา/เอกสารประกอบการสอน

รายวิชา: พันธุศาสตร์ ISBN 974-7479-45-1

ชีววิทยาของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ไมโครเทคนิค

จุลชีววิทยา

วิทยาศาสตร์เพื่อคุณภาพชีวิต

วิทยาศาสตร์ในชีวิตประจำวัน

## 8. ประวัติการศึกษา และประวัติการทำงาน

### ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี : กศ.บ.(ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร  
กรุงเทพฯ เมื่อ พ.ศ. 2518

ปริญญาโท : วท.ม. (ชีววิทยา-พันธุศาสตร์) จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ เมื่อ พ.ศ. 2526

ปริญญาเอก : Ph.D. ( spect in Tissue Culture and Genetics) จากUP LOSBANOS  
เมื่อ พ.ศ.2542